

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

FONDÉES SOUS LE PATRONAGE DE **L. PASTEUR**

PAR

**E. DUCLAUX**

ET CONTINUÉES PAR

**E. ROUX (1904)**

**A. CALMETTE (1922)**

COMITÉ DE DIRECTION

**Gab. BERTRAND, E. LECLAINCHE, L. MARTIN,  
G. RAMON,**

assistés des Professeurs et Chefs de service de l'Institut Pasteur,

*Secrétaire général : A. BOQUET.*

QR

1

A475

TOME SOIXANTE-QUATRIÈME

V.64-66

Janvier-Juin 1940

Jan. 1940-

June 1941

PER

PARIS

MASSON ET C<sup>ie</sup>, ÉDITEURS  
LIBRAIRES DE L'ACADEMIE DE MÉDECINE  
120, Boulevard Saint-Germain (6<sup>e</sup>).

corpusculaire et apporta différents arguments en faveur de cette façon de voir (3). Par la suite, des expériences plus précises l'établissaient d'une manière non douteuse (4). Ainsi que l'écrivait en 1927 l'un de nous : « C'est certainement par l'état discontinu des bactériophages (d'Hérelle) et non par celui du substratum (Bordet) que s'explique le phénomène des *plages stériles* ou *taches vierges* ». Mais si l'état discontinu, corpusculaire des facteurs lysogènes a été reconnu de bonne heure, les données relatives à leurs dimensions sont restées pendant longtemps contradictoires.

### I. — Dimensions des bactériophages et ultrafiltration.

Dès 1918, d'Hérelle avait annoncé que les bactériophages traversent certaines membranes de collodion (5). L'un de nous avait également constaté ce fait au cours d'expériences de dialyse (6).

Afin de préciser les dimensions des bactériophages, d'Hérelle, dans une nouvelle série d'expériences, les filtre sur collodion en présence de sérum sanguin, ce qui le conduit à attribuer aux facteurs lysogènes les dimensions des molécules de globuline sérique (7). Prausnitz soumet à la filtration, sur membranes de Haen de porosité connue et graduée, d'une part un bactériophage dysentérique, de l'autre du collargol, de la gélatine et de l'hémoglobine (8). Il conclut de ses expériences que la taille de ce bactériophage est très voisine de celle du collargol employé, soit environ 20  $\mu$  de diamètre, et notablement supérieure à celle des diastases (trypsine, pepsine) qui passent librement à travers les membranes utilisées. Des expériences d'ultrafiltration amènent Biemond (9) à une conclusion analogue : les dimensions du bactériophage étudié

(3) *C. R. Soc. de Biol.*, **89**, 1923, p. 231.

(4) D'HÉRELLE. Le bactériophage et son comportement, 2<sup>e</sup> édition, 1926, E. Wollman. *Ces Annales*, **41**, 1927, p. 883.

(5) *C. R. Soc. de Biol.*, **81**, 1918, p. 1160.

(6) *Ibid.*, **84**, 1921, p. 3.

(7) *Le Bactériophage, etc.*, 1921.

(8) *Zentralbl. f. Bak.* I, **89**, 1922, p. 187.

(9) *Zeitschr. f. Hyg.*, **103**, 1924, n. 681.

(B. Shiga) sont très supérieures à celles des molécules de séro-albumine ou d'hémoglobine et dépassent 20  $m\mu$  de diamètre. Par contre, d'après Stassano et Beaufort (10), les facteurs lysogènes traverseraient, sans perte notable, des filtres imperméables au nitrate de strychnine (poids moléculaire = 397).

Se servant de membranes de collodion acétique introduites par lui dans la pratique de l'ultrafiltration, Bechhold, en collaboration avec Villa, compare le comportement d'un bactériophage (B. coli) et du collargol et attribue au premier un diamètre supérieur à 35  $m\mu$  (11). Utilisant la même technique, Wollman et Suarez constatent qu'un bactériophage du B. Shiga traverse des membranes à 7 p. 100 de nitrocellulose (12). La rétention est assez prononcée, surtout pour les premières portions de filtrat ; mais même après deux heures de filtration, sous un vide de 50 millimètres, 1 p. 300 seulement du bactériophage se retrouve dans le filtrat. Des essais de contrôle montrent, du reste, que 80 p. 100 environ de bactériophage sont absorbés par le collodion. Le bactériophage étudié passe encore à travers des filtres à 8 et même 10 p. 100 de nitrocellulose, quoique en quantités de plus en plus faibles. Or, des expériences parallèles, faites avec des solutions d'hémoglobine et de séro-albumine, établissent que les membranes à 7 p. 100 de nitrocellulose fournissent des filtrats dans lesquels on ne décèle plus les substances étudiées (épreuve spectroscopique pour l'hémoglobine ; celles du  $NO_3H$  et du choc anaphylactique pour la séro-albumine). Rappelons, pour être complet, que les filtres à 7 et même 8 p. 100 de nitrocellulose, imperméables à la séro-albumine, laissent encore passer des protéines bactériennes coagulables.

Toujours par filtration sur collodion acétique, Eliava et Suarez assignent, au bactériophage du B. Shiga, un diamètre de 5  $m\mu$  (13). Bronfenbrenner se sert de collodion acétique ainsi que de collodion à l'alcool-éther. Pour lui, la rétention variable d'un bactériophage à l'autre s'expliquerait par le

(10) *C. R. Soc. de Biol.*, **93**, 1925, p. 1378.

(11) *Zeitschr. f. Hyg.*, **105**, 1926, p. 601.

(12) *C. R. Soc. de Biol.*, **96**, 1927, p. 15 ; ces *Annales*, **41**, 1927, p. 891.

(13) *C. R. Soc. de Biol.*, **96**, 1927, p. 462.

fait que le principe actif est adsorbé sur des supports inertes de grandeurs différentes ; la taille des éléments actifs eux-mêmes serait très faible et uniforme pour les divers bactériophages (14). Enfin, plus récemment, Jermoljeva et ses collaborateurs arrivent à la conclusion que les bactériophages sont des substances non protéiques dont les molécules auraient un diamètre de  $2 \text{ m}\mu$  (15).

Ce bref historique montre assez combien décevant est resté, pendant longtemps, l'apport de l'ultrafiltration : suivant les expérimentateurs, les dimensions des bactériophages sont tantôt très inférieures à celles des molécules d'ovalbumine ( $3 \text{ m}\mu$ ), tantôt dépassent  $35 \text{ m}\mu$  de diamètre.

La discordance des résultats s'explique en grande partie par la complexité des facteurs en jeu dans l'ultrafiltration, tout aussi bien d'ailleurs que dans la filtration ordinaire. Sans nous étendre sur cette question (16), rappelons le rôle que jouent, en dehors de la seule dimension des pores, la charge électrique et l'adsorption, ces deux facteurs étant eux-mêmes fonction de la nature du milieu dans lequel se trouvent les éléments étudiés (composition, pH, point isoélectrique des protéides, concentration des électrolytes, etc...).

Reprendons, à titre d'exemple, un des travaux cités plus haut (12). Le bactériophage était contenu dans du lysat de *B. Shiga* en bouillon, alors que l'hémoglobine et l'albumine sérique servant de tests de comparaison se trouvaient en suspension dans l'eau physiologique. Or, ainsi que le montraient deux ans plus tard Ward et Tang (17), le bouillon favorise de façon considérable le passage des virus par les bougies filtrantes (18). Plus récemment, cette action favorisante du bouillon a été étendue à l'ultrafiltration sur collodium (virus

(14) *Journ. Exp. Med.*, **45**, 1927, p. 873.

(15) *Zeitschr. f. Immunitätsf.*, **73**, 1932, p. 360.

(16) Elle a été traitée, avec toute la compétence voulue, par P. Grabar (*Bull. Soc. Chim. Biol.*, **17**, 1935, p. 1245) et Elford (in Doerr et Halauer, *Handbuch f. Virusforschung*, 1938).

(17) *Journ. Exper. Med.*, **49**, 1929, p. 1.

(18) C'est pour avoir méconnu ces faits que l'un de nous avait conclu, à tort, à l'absence de bactériophage libre dans les suspensions en eau physiologique de *B. megatherium* lysogène.

aphteux) par Elford et Galloway (19). Le bactériophage, d'une part, l'hémoglobine et l'albumine sérique d'autre part, étant contenus lors de la filtration dans des excipients différents, on n'était nullement fondé à tirer des conclusions quant à leurs dimensions relatives.

D'autres facteurs interviennent encore pour fausser l'interprétation des expériences. C'est ainsi que l'adsorption peut varier d'intensité pour des substances différentes, contenues dans un même excipient.

Enfin, les membranes de collodion acétique, presque exclusivement employées jusque-là dans les recherches sur les dimensions des bactériophages, se prêtent mal à cet usage. Leur porosité est, en effet, loin d'être homogène, le diamètre maximum des pores pouvant être dans le rapport de 10 à 1 au diamètre moyen (Elford). Ce fait constitue une cause d'erreur importante en faveur de substances pour lesquelles les réactifs sont particulièrement sensibles (cas des bactériophages).

Ces critiques disparaissent avec les beaux travaux d'Elford. Rejetant le collodion acétique, cet expérimentateur s'adresse aux membranes en collodion à l'alcool-éther et augmente leur porosité trop faible en ajoutant, à ces solvants, de l'alcool amylique et de l'acétone en proportions définies. En réglant minutieusement les détails de leur préparation, il obtient, par évaporation, des membranes de porosité constante, le diamètre moyen des pores étant de  $750 \text{ m}\mu$ . Cette porosité peut être augmentée ou diminuée à volonté en ajoutant, à la solution-mère, de l'eau (qui diminue la solubilité du collodion) ou de l'acétone (qui augmente celle-ci). On obtient ainsi une série de membranes de structure fort homogène (le rapport du diamètre maximum au diamètre moyen des pores ne dépassant pas 2 : 1) et de porosité graduée (filtres Gradocol), comprise entre  $3.000 \text{ m}\mu$  et moins de  $10 \text{ m}\mu$ . Une étude approfondie des facteurs intervenant dans l'ultrafiltration (pression, température, adsorption, réaction, nature du milieu) a permis d'éviter les erreurs qui entachaient les premières recherches rapportées ci-dessus.

(19) *Brit. Journ. Exp. Path.*, **12**, 1931, p. 407.

Elford et ses collaborateurs ont ainsi pu étudier, dans des conditions définies et comparables, le comportement d'objets fort divers (bactéries, virus, bactériophages, protéides) au cours de l'ultrafiltration. Ce comportement est chaque fois défini par une courbe groupant les résultats obtenus avec des filtres de porosité décroissante, ainsi que par « le point terminal » c'est-à-dire le diamètre maximum des pores qui retiennent la totalité de l'objet étudié.

Comparant ces données avec celles fournies par d'autres méthodes (photographie en lumière ultraviolette pour les bactéries et les plus gros virus, ultracentrifugation pour d'autres virus, les bactériophages et les protéides), les auteurs (20) établissent empiriquement un fait très important, à savoir que le rapport entre le diamètre des éléments étudiés et celui des pores maxima (« point terminal ») qui les retiennent totalement est variable. Voisin de l'unité pour les porosités élevées ( $d = 1.000 \text{ m}\mu$ ), il descend à  $1/3$  pour les pores de  $20 \text{ m}\mu$  environ, pour remonter de nouveau pour les porosités les plus faibles. Le diamètre des éléments étudiés est ainsi donné par la relation

$$e = Fd$$

où  $e$  est le diamètre cherché,  $d$  celui des pores maxima (« point terminal ») pour lesquels la rétention est complète et  $F$  un facteur de correction obtenu empiriquement et dont la valeur varie ainsi qu'il vient d'être dit. Ce n'est qu'en tenant compte de cette relation qu'il devient possible de déduire, des résultats de l'ultra-filtration, les dimensions d'éléments de l'ordre de grandeur de ceux que nous étudions (21) : dans la région qui nous intéresse, la valeur de  $F$  varie entre  $1/2$  et  $1/3$ .

(20) *Journ. Roy. Micr. Soc.*, **48**, 1928, p. 36 ; *Journ. Pathol. et Bact.*, **34**, 1931, p. 505 ; *Proc. Roy. Soc. Ser. B., Biol. Sc.*, **112**, 1923, p. 384 ; Elford, *loc. cit.*

(21) ELFORD et ANDREWES. The sizes of different bacteriophages. *Brit. Journ. Exper. Path.*, **13**, 1932, p. 446.

## II. — Dimensions des bactériophages et ultracentrifugation.

A peu près simultanément, une autre méthode a été mise à contribution : l'ultracentrifugation (ou centrifugation à très grande vitesse), basée sur la loi de Stokes qui régit la chute d'éléments en suspension dans un milieu liquide sous l'action de la gravitation :

$$v = \frac{2}{9} \frac{r^2(de - dm)F}{\eta}$$

$v$  étant la vitesse de sédimentation ;  $de$  et  $dm$  les densités respectives des éléments étudiés et du milieu ;  $\eta$  la viscosité de ce dernier ;  $F$  la force de gravitation (remplacée dans ces expériences par la force centrifuge) ; enfin  $r$ , le rayon des éléments dont on cherche à préciser les dimensions. Notons que la formule de Stokes n'est applicable qu'à des éléments de forme sphérique et exige la connaissance de leur densité. Diverses méthodes ont été proposées pour déterminer celle-ci, mais leur application, à des éléments biologiques comme les bactériophages, se heurte à de grandes difficultés. De ce fait, les résultats fournis par l'ultracentrifugation ont été, pendant un certain temps, entachés d'incertitude.

C'est à Bechhold et Schlesinger (22), surtout à ce dernier (23), que nous devons les premiers essais systématiques de détermination de la dimension des bactériophages au moyen de l'ultracentrifugation. Schlesinger a non seulement établi une formule nouvelle, s'appliquant aux conditions réalisées dans les tubes à centrifuger, il a également perfectionné la technique en tapissant le fond des tubes avec du papier filtre épais, ce qui évite la remise en suspension des éléments sédimentés.

Les données obtenues par Schlesinger constituent, avec celles d'Elford, la base de nos connaissances sur les dimen-

(22) *Biochem. Zeitschr.*, **236**, 1931, p. 387 ; *Zeitschr. f. Hyg.*, **115**, 1933, p. 342 et 354.

(23) *Zeitschr. f. Hyg.*, **114**, 1932, p. 161 ; *Biochem. Zeitschr.*, **264**, 1933, p. 6 ; *Zeitschr. f. Hyg.*, **115**, 1933, p. 746 ; *Ibid.*, p. 774 ; *Kolloid-zeitschr.*, **67**, 1934, p. 135 ; *Nature*, **138**, 1936, p. 549.

TABLEAU I.

BACTÉRIOPHAGE	DIAMÈTRE en $\mu$	MÉTHODE employée	AUTEURS
Dysentérique S43 .	8-12	Ultrafiltration.	Elford et Andrewes.
<i>B. pruni</i> . . . .	8-12	Ultrafiltration.	Thornberry (cité d'après Elford).
Dysentérique S43 .	20	Ultracentrifug.	Schlesinger (1).
Dysentérique S43 .	12-20	Ultracentrifug.	Elford.
Dysentérique S43 .	45-47	Ultracentrifug.	Elford.
Coli-dysentér. C43.	15-40	Ultrafiltration.	Elford et Andrewes.
Coli-dysentér. C36.			
Coli-dysentér. D13.	20-30	Ultrafiltration.	Elford et Andrewes.
Coli-dysentér. D18.			
Coli-dysentér. D20.			
Coli-dysentér. D20.	50	Ultracentrifug.	Schlesinger (1).
Coli-dysentér. D34.			
Coli-dysentér. S41.	30-45	Ultrafiltration.	Elford et Andrewes.
<i>B. megatherium</i> . .	20-50	Ultrafiltration.	Levaditi, Païc, Voet et Krassnoff.
<i>B. megatherium</i> . .	30-37	Ultracentrifug.	Tang, Elford et Galloway.
Coli-dysentér. C21.	75	Ultracentrifug.	Schlesinger.
Coli-dysentér. L. . .			
Coli-dysentér. D4 .	50-75	Ultrafiltration.	Elford et Andrewes.
Coli-dysentér. D12.			
Coli-dysentér. C16.			
Coli-dysentér. D4 .	60-70	Ultrafiltration.	Yaoi et Sato.
Coli-dysentér. D12.			
Coli-dysentér. C16.			
Staphyl. S3K . . .	50-75	Ultracentrifug.	Schlesinger (1).
Staphyl. S3K . . .	60-70	Ultrafiltration	Elford et Andrewes.
Staphyl. S3K . . .	90	Ultracentrifug.	Elford.
Coli WLL . . . .	90	Ultracentrifug.	Schlesinger (1).
Coli WLL . . . .	60-75	Ultracentrifug.	Schlesinger (1).
Typhique 105 $\alpha$ . . .	60-90	Ultrafiltration.	Elford.
Typhique 105 $\alpha$ . . .	70-75	Ultracentrifug.	Elford.
<i>Subtilis</i> . . . . .	80-120	Ultrafiltration.	Levaditi, Païc, etc.

(1) Ainsi que nous l'avons déjà dit, les valeurs trop élevées de Schlesinger s'expliquent par la faible densité (1,12) attribuée aux bactériophages par ce savant.

sions des bactériophages. Les valeurs de Schlesinger paraissent toutefois être quelque peu trop élevées. Ce savant avait admis, en effet, pour la densité des bactériophages, une valeur trop faible (1,12), voisine de celle des bactéries. En remplaçant ce chiffre par celui de 1,25 (Elford) [densité approximative des protéines], on retrouve très sensiblement les valeurs obtenues dans les expériences d'ultrafiltration.

Récemment, Elford (24) a perfectionné la technique en utilisant un tube capillaire renversé, contenant la suspension étudiée et plongeant lui-même dans du liquide renfermant la même suspension. Dans ces conditions, les perturbations dues

(24) *Brit. Journ. Exp. Path.*, 17, 1936, p. 399.

aux courants de convection ainsi qu'à l'agitation se trouvent réduites au minimum. Avec ce dispositif, qui permet de suivre la sédimentation des bactériophages concentrés soit directement, soit photographiquement, Elford et ses collaborateurs ont mesuré les dimensions de plusieurs bactériophages ; les valeurs obtenues concordent avec celles fournies par l'ultrafiltration (25).

Les données du tableau I font ressortir une concordance remarquable, non seulement entre les résultats obtenus avec une même technique par des auteurs différents, mais aussi entre ceux fournis par les deux méthodes employées. On peut en inférer que les dimensions ainsi assignées aux bactériophages correspondent de fort près à la réalité, ce qui permet d'envisager l'étude de relations possibles entre ces dimensions et le comportement des bactériophages vis-à-vis de divers agents (26). Pour des raisons que nous allons exposer, l'action des rayons X paraissait présenter, à ce point de vue, un intérêt particulier.

### III. — Dimensions des bactériophages et radiosensibilité.

#### 1° HISTORIQUE.

La presque totalité des travaux consacrés, jusqu'ici, à l'action des radiations sur les bactériophages se rapportent aux rayons ultraviolets. Les auteurs (27) se bornent généra-

(25) *Brit. Journ. Exp. Path.*, **18**, 1937, p. 269 ; ELFORD, in Doerr et Hallauer, Vienne, 1938, p. 208.

(26) L'étude de l'action des ultrapressions sur les bactériophages et les virus a montré qu'il n'y a pas de relation entre les dimensions de ces éléments et leur comportement à la pression (Ces *Annales*, **58**, 1937, p. 58). Des recherches inédites, poursuivies à ce point de vue sur les bactériophages [en collaboration avec M<sup>me</sup> Wollman, Basset (E.) et Macheboeuf (M.)], ont confirmé ce fait.

(27) APPELMANS, ZOELLER, GILDEMEISTER, BREMOND, Mc KINLEY, FISHER et Mc KINLEY, CRAKER et NANAVUTTY, MIZANO, LEVADITI et collab., GERRETSEN, etc. La très grande instabilité des bactériophages irradiés en eau physiologique et l'action protectrice du bouillon ont été bien mis en évidence au cours de ces recherches. Signalons, d'autre part, quelques travaux sur l'action du radium (Brutsaert, 1923 ; Baker, 1935), du radon (Lacassagne et Paulin, 1925 ; Ebert et Peretz, 1931).

lement à comparer l'action antibactériophage de ce rayonnement avec son action bactéricide. Les résultats sont assez discordants. En prenant pour unité le temps de stérilisation d'une culture bactérienne, les durées nécessaires pour inactiver les bactériophages, dans les mêmes conditions, varieraient de 1 (Gildemeister) à 8 (Gerretsen).

Les travaux de Gates apportent plus de précision (28). Etant données les grandes différences quantitatives et qualitatives de l'action biologique spécifique des diverses longueurs d'onde, Gates utilise des rayons ultraviolets monochromatiques ( $\lambda$  230 à  $\lambda$  297). Compte tenu des quantités d'énergie fournie, l'allure générale des courbes traduisant l'action bactéricide et l'action antibactériophage est la même pour toutes les longueurs d'onde étudiées. La quantité d'énergie requise pour détruire le bactériophage staphylococque varie de 710 ( $\lambda$  266) à 7.250 ( $\lambda$  297) ergs par millimètre carré.

Cette similitude des courbes qui traduisent l'action bactéricide et l'action antibactériophage des R. U. V. est, d'après Gates, particulièrement frappante et ne saurait s'expliquer que par l'identité des réactions en jeu dans les deux cas. Toutefois, quelle que soit la longueur d'onde employée, la quantité d'énergie requise pour inactiver le bactériophage est, en règle générale, supérieure à celle qu'il faut employer pour stériliser la culture bactérienne.

Alors que les recherches de Gates ne portent que sur un seul germe — le staphylocoque doré — et sur le bactériophage correspondant, Hallauer (29) a étudié l'action des rayons ultraviolets sur 27 espèces bactériennes et 4 bactériophages de dimensions différentes ; il est arrivé aux conclusions suivantes : 1<sup>o</sup> le maximum de sensibilité de tous les bactériophages étudiés se situe sensiblement dans les mêmes régions du spectre U. V. ; ces régions coïncident avec celles du maximum d'action bactéricide ; 2<sup>o</sup> il n'y a pas de différence marquée entre la radiosensibilité des bactériophages et des bactéries. Toutefois, les bactériophages de petite taille :

(28) *Journ. gen. Physiol.*, **13**, 1929, p. 231 ; **14**, 1931, p. 31 ; **18**, 1934, p. 35 ; *Journ. exp. Med.*, **60**, 1934, p. 179 ; *Science*, **68**, 1928, p. 479.

(29) *Zeitschr. f. Hyg.*, **117**, 1935, p. 18.

S 13 (10-12 m $\mu$ ) et Coli 36 (20-30 m $\mu$ ) sont plus résistants aux grandes longueurs d'onde ( $\lambda$  280-290 m $\mu$ ) que le gros bactériophage S 3 K (50-75 m $\mu$ ) et les bactéries. Le plus petit des bactériophages étudiés, S 13, se montre également plus résistant aux petites longueurs d'onde ( $\lambda$  210-220 m $\mu$ ).

Campbell-Renton (30) fait agir les rayons ultraviolets sur 3 bactériophages produisant des plages de grandeur différente : la radiorésistance variait considérablement d'un facteur lysogène à l'autre, la durée d'irradiation nécessaire pour détruire le plus résistant étant six à huit fois plus grande que celle inactivant le plus sensible. Il n'y aurait pas de relation entre la grosseur des plages produites par un bactériophage donné et sa sensibilité aux R. U. V. Or, les courbes de la planche 41, du travail de Campbell-Renton, se rapportant aux bactériophages D M 17 (à grandes plages) et D M 14 (à petites plages) actifs sur un même germe, montrent que le premier de ces bactériophages est beaucoup plus résistant que le deuxième (destruction en trois cents et trente secondes respectivement). La relation signalée par Burnet et Andrewes entre les dimensions des plages et celles des bactériophages, d'après laquelle ces deux grandeurs sont inverses l'une de l'autre, semble ne se vérifier que si toutes les autres conditions (en particulier les propriétés du germe sensible) restent les mêmes. C'est précisément le cas des 2 bactériophages en question puisqu'ils sont actifs sur la même bactérie : on peut en inférer que, dans ce cas, le bactériophage plus résistant D M 17 était plus petit que le bactériophage D M 14.

Quant à l'action des rayons X sur les bactériophages, nous n'avons pu relever que deux publications sur ce sujet.

Becwith, Olson et Rose (31) ont irradié des bactériophages et des souches bactériennes dans l'espoir de voir se produire des variations (H. J. Muller, etc.). Les résultats obtenus ne paraissent guère convaincants.

Tout récemment E. Wright et H. Kersten (32) ont fait agir, sur des bactériophages, des rayons mous monochromatiques

(30) *Journ. Path. and Bact.*, **45**, 1937, p. 237.

(31) *Proc. Soc. exper. Biol. and Med.*, **27**, 1930, p. 285.

(32) *Journ. Bact.*, **34**, 1937, p. 639.

du spectre X du Cu. Ils n'ont pas constaté d'inhibition appréciable après une heure d'irradiation, ce qui paraît être dû à la technique employée pour déceler une inhibition éventuelle. Ce n'est guère qu'après quatre à six heures d'irradiation que les courbes d'opacification des cultures en bouillon se rapprochent de celles des cultures témoins (sans bactériophage). Les auteurs concluent que les bactériophages sont inégalement sensibles à l'action des rayons X mous ; l'inhibition augmente avec la quantité de rayons X reçus.

## 2<sup>o</sup> POSITION DU PROBLÈME.

Nos propres recherches ont eu pour point de départ les considérations suivantes :

De nombreux faits expérimentaux ont conduit à admettre que la radiosensibilité est la conséquence de l'altération de la matière vivante sous l'effet des ions libérés au moment de l'absorption d'un rayonnement. Celle-ci, ayant lieu d'une façon discontinue, par quanta, les lésions provoquées par les projectiles ionisants auront d'autant plus de chances d'être produites, dans un élément vivant, que celui-ci offrira une « cible » plus volumineuse. On trouvera l'exposé détaillé de cette question dans un article synthétique de Holweck et Lacassagne (33).

Nous nous bornerons à indiquer ici qu'une irradiation uniformément répartie sur les cellules d'une culture (bactéries, levures ou protozoaires) provoque cependant des lésions inégales parmi ces cellules de même espèce. Il est possible de distinguer au microscope, dans les éléments irradiés, un certain nombre de types de lésions, toujours les mêmes, se rencontrant en proportions variables suivant la dose administrée. On a pu établir que chacune de ces lésions correspond à l'atteinte d'un organite essentiel de la cellule (ou zone sensible). Il devient dès lors possible d'apprécier, par le calcul des probabilités, les chances qu'a cet organite d'être lésé, si l'on connaît : son volume, le nombre de quanta absorbés par unité de volume au cours de l'irradiation, et le nombre minimum

(33) *Radiophysiolie et Radiothérapie*, 3, 1934, p. 215 et 235.

de quanta devant atteindre cette cible pour produire la lésion considérée. Les expériences d'Holweck et Lacassagne ont montré que la fréquence avec laquelle apparaissent certaines lésions chez *Saccharomyces ellipsoideus* et chez *Polytoma uvella* tend à prouver qu'elles coïncident avec le volume occupé dans la cellule par le noyau (34) ; cette méthode a permis d'admettre l'existence d'un centrosome dans la levure et d'en donner les dimensions (0,1 m $\mu$ ), avant que ce centrosome ait été mis en évidence dans la levure par les cytologues (35).

Il a paru intéressant d'étendre cette méthode à l'étude des facteurs lysogènes. On pouvait penser, en effet, que dans le cas des éléments très petits, peu ou même non différenciés que sont les bactériophages, la zone sensible pourrait coïncider avec l'objet lui-même. S'il en est bien ainsi, le degré de radiosensibilité des bactériophages doit être fonction de leurs dimensions et permettre d'évaluer celles-ci. Nos résultats expérimentaux paraissent en faveur de cette façon de voir (36).

### 3° TECHNIQUE.

Toutes les irradiations ont été réalisées au moyen d'un tube Philips-Metalix de 2 kilowatts, à anticathode en molybdène refroidie à l'eau, fournissant un faisceau très intense de rayons X de 0,7 Å ; foyer circulaire, correspondant à une fenêtre de sortie (de 30 millimètres de diamètre) en verre de Lindemann. Dans une première série d'expériences, le tube fonctionnant sur tension alternative non redressée, de 40 kilovolts, avec une intensité de 33 milliampères, sans filtre, la dose calculée à 6 cent. 5 de l'anticathode, d'après des mesures

(34) *C. R. de la Soc. de Biol.*, **107**, 1931, p. 812 et 814.

(35) J. RENAUD. *C. R. Acad. des Sciences*, **206**, 1938, p. 1918.

(36) Déjà, s'appuyant sur les résultats expérimentaux de Lacassagne et Nyka relatifs à la radiosensibilité du virus vaccinal (*C. R. Soc. de Biol.*, **127**, 1938, p. 1115), Holweck a cherché à calculer les dimensions de cet élément (*C. R. Acad. des Sciences*, **207**, 1938, p. 380). Il a attribué à la zone sensible un diamètre de 85 m $\mu$ , c'est-à-dire une valeur deux fois plus faible que celle trouvée pour la vaccine par ultrafiltration et ultracentrifugation (150-180 m $\mu$ ). Ce fait serait d'un grand intérêt s'il était confirmé, car il pourrait être en relation avec la constitution relativement complexe du virus vaccinal (Hughes, Parker et Rivers).

faites à la chambre d'ionisation, a été trouvée d'environ 8.800 r-minute. Plus tard, le tube a fonctionné sur tension alternative redressée ; 40 kilovolts ; 30 milliampères ; dose à 6 cent. 3 de l'anticathode : environ 13.000 r-minute. En cas d'irradiation avec filtre de zirconium de 0 millim. 06, le rendement en unités r était diminué d'un peu moins des 2/3 (37).

Dans les expériences initiales, les bactériophages (lysats de cultures bactériennes sensibles en bouillon, filtrés sur bougie Chamberland ; cultures en bouillon filtrées, dans le cas du *B. megatherium* lysogène) étaient étalés à la surface de la gélose coulée en boîte de Petri de 3 cent. 3 de diamètre. Dans ces expériences d'orientation, on étalait 1 goutte ou une anse de bactériophage non dilué. Plus tard, on s'est servi de dilutions des bactériophages à irradier, de manière à obtenir des plages séparées, en quantités facilement dénombrables (généralement plusieurs centaines). Ces boîtes de gélose étaient soumises à l'action des rayons X pendant un temps déterminé, et ensemencées ensuite avec les germes sensibles correspondants. Le degré de lyse présenté par les boîtes irradiées pendant des temps variables, comparé à celui des boîtes témoins non irradiées, permettait d'apprécier la résistance aux rayons X des bactériophages éprouvés, c'est-à-dire leur degré de radiosensibilité.

Dès les premiers essais, il était devenu évident que cette dernière était très faible, mais variable pour chaque bactériophage. C'est ainsi qu'un bactériophage du *B. subtilis* a été fortement inhibé par une irradiation de quarante-cinq minutes (400.000 unités r environ) ; le bactériophage du *B. megatherium* (De Jong) a été inactivé aux environs de 1.000.000 de r ; enfin le bactériophage dysentérique S 13 (Burnet) a résisté partiellement à plus de 2.000.000 de r. Il suffit de consulter le tableau I pour constater que les bactériophages éprouvés se sont montrés d'autant plus radiorésis-

(37) D'inévitables irrégularités de régime, présentées par un appareillage utilisé pendant plusieurs années, expliquent, sans doute, certains écarts entre les résultats d'irradiations faites théoriquement avec la même intensité. Seuls sont strictement comparables les résultats obtenus au cours d'une même séance d'irradiation.

tants qu'ils sont plus petits. Ces expériences préliminaires paraissaient ainsi fournir une indication sur l'existence d'une relation entre les dimensions des facteurs lysogènes et leur radiosensibilité (38).

Pour préciser ce point, nous nous sommes adressés tout d'abord à deux bactériophages du groupe coli-dysentérique

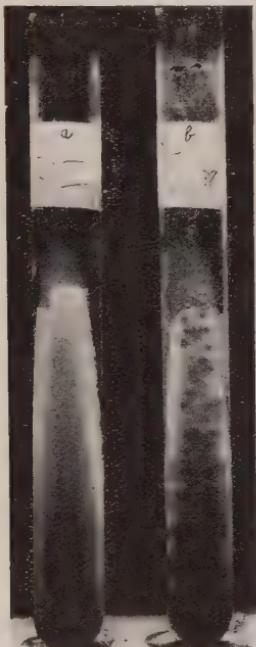


FIG. 1. — Bactériophages dysentériques C16 (a) et S13. Les dilutions à  $10^{-5}$  ont donné le même nombre de plages (environ 90) d'où il ressort que ces bactériophages avaient le même titre. On remarquera les dimensions très différentes des plages en présence de la même bactérie sensible. (Les photographies dans le texte sont dues à M. P. Jeantet, chef du service photographique de l'Institut Pasteur.)

étudiés par Burnet (39), actifs l'un et l'autre sur un même germe, le bacille dysentérique Y6R. L'un de ces bactériophages, S 13, est le plus petit de ceux actuellement connus

(38) Toutefois, il n'a pas été tenu compte, dans ces expériences, du titre des bactériophages employés.

(39) *J. Path. and Bact.*, 36, 1933, p. 307. Nous devons ces bactériophages, ainsi que la souche sensible à l'obligeance de M. W. J. Elford.

et mesure 10-12  $m\mu$  de diamètre. Le second, C 16, aurait un diamètre de 50-75  $m\mu$  pour Elford et Andrewes (40), Schlesinger (41) lui assigne un diamètre de 90  $m\mu$  à la suite d'expériences d'ultracentrifugation (valeur qu'il faut considérer, nous l'avons vu, comme trop forte).

Ici encore, les essais préliminaires ont été effectués en étalant, à la surface de la gélose d'une petite boîte de Petri (3 cent. 5 de diamètre), une anse de chacun des bactériophages étudiés. Les lysats employés dans ces expériences ayant très sensiblement le même titre, les résultats étaient directement comparables (fig. 4).

#### 4° EXPÉRIENCES PRÉLIMINAIRES.

On coule de la gélose à 2,5 p. 100 dans deux boîtes de Petri de 3 c. c. 5 de diamètre. Sur la moitié de la surface de chaque boîte, on étale une anse de lysat S 13, sur l'autre une anse de lysat C 16. Une des boîtes est exposée aux rayons X (pendant deux heures pour la moitié recouverte de C 16, pendant trois heures pour celle recouverte de S 13). On étale ensuite, à la surface de la boîte irradiée et de la boîte témoin (séparément pour les deux moitiés de chaque boîte), la suspension de *B. dysentérique* Y6R sensible.

Ainsi que le montre la photographie (fig. 2), le bactériophage C 16 a été détruit en deux heures (environ 1.000.000 r), alors que le bactériophage S 13 a résisté en très grande partie à une irradiation de trois heures (environ 1.600 000 r).

Dans une autre expérience préliminaire, faite avec la même technique, les bactériophages C 16 et S 13 (de même titre) ont été irradiés respectivement pendant une heure un quart (environ 660.000 r) et quatre heures (environ 2.100.000 r) : un petit nombre d'éléments de chaque bactériophage (8-9 et 13 respectivement) ont résisté à ce traitement.

Ces expériences établissaient la grande différence de radiosensibilité existant entre les deux bactériophages étudiés, le plus petit de ces bactériophages étant de beaucoup le plus résistant.

(40) *Brit. Journ. Exp.*, **13**, 1932, p. 446.

(41) *Biochem. Zeitschr.*, **264**, 1933, p. 6.

5<sup>e</sup> ÉTUDE DE LA DIFFÉRENCE DE RADIOSENSIBILITÉ  
DES BACTÉRIOPHAGES C 16 ET S 13.

Afin de pouvoir suivre quantitativement la destruction des facteurs lysogènes par les rayons X, on a, dans les expériences



FIG. 2. — Action des rayons X sur les bactériophages C16 et S13. Destruction du bactériophage C16 en deux heures (a). Conservation partielle du bactériophage S13 après trois heures d'irradiation (b). Ce dernier bactériophage produit de grandes plages qui se remplissent de bonne heure d'un semis de petites colonies secondaires.

qui suivent, étalé à la surface de la gélose non plus les lysats bactériophagiques tels quels, mais des dilutions de ces lysats fournissant des plages (plusieurs centaines par goutte ou par anse) faciles à dénombrer. La dilution convenable de lysat était étalée à la surface de la gélose dans de petites boîtes de Petri, deux boîtes étant préparées pour chaque échantillon (lysat témoin et lysats irradiés pendant des durées variables). Les expériences comportaient ainsi deux séries de résul-

tats parallèles, la numération des plages étant faite par deux observateurs différents, tantôt pour les deux séries, tantôt pour chaque série séparément. Dans la plupart des expériences sur le bactériophage C16 (le plus sensible), le rayonnement était filtré sur 0 millim. 06 de zirconium. Le tableau II résume les résultats de cette série d'expériences.

Tout en confirmant la très grande différence de radiosensi-

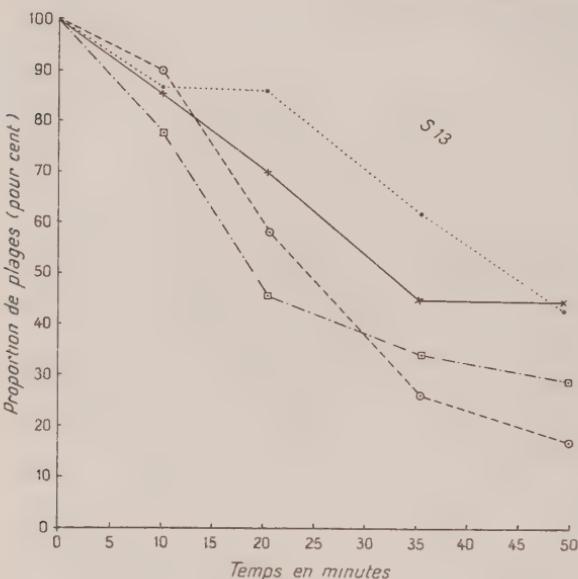


FIG. 3 A.

bilité des bactériophages C 16 et S 13, les données contenues dans le tableau II fournissent de cette différence une expression quantitative approximative. En effet, en irradiant (sans filtre) le bactériophage C 16, le nombre des plages se trouve réduit, dans les conditions des expériences, à 4,5 p. 100, en moyenne, en dix minutes et à 2,5 p. 100 environ en quatorze minutes. Or, irradié dans les mêmes conditions pendant cinquante minutes, le bactériophage S 13 conserve encore 30 p. 100 environ d'éléments actifs.

La figure 3 reproduit les résultats de cette série d'expériences.

On a figuré, en A, les données fournies par chacune des

quatre expériences portant sur le bactériophage S 43. Les tracés montrent des irrégularités qui doivent être attribuées à l'imperfection de la technique employée : a) irradiation des lysats étalés à la surface de la gélose ; b) intervalle de durée variable entre l'étalement et l'irradiation ; c) enfin et surtout, le fait que la quantité de bactériophages étalés n'était pas rigoureusement la même pour les divers échantillons d'une

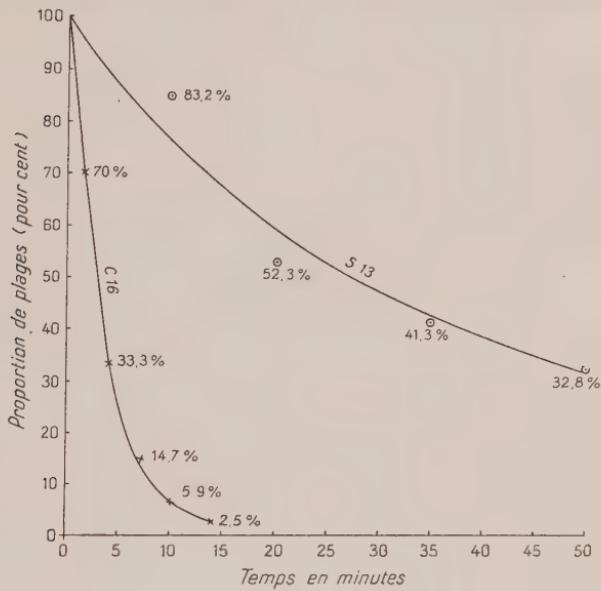


FIG. 3 B.

FIG. 3. — En A, quatre expériences d'irradiation du bactériophage S 43. En B, moyennes de quatre expériences pour le bactériophage S 43 ainsi que de deux expériences pour le bactériophage C 16. En ordonnée, la proportion de plaques (éléments) pour cent. En abscisse, la durée d'irradiation en minutes.

même expérience, la goutte de lysat étant déposée au moyen d'une pipette Pasteur différente d'un échantillon à l'autre.

En B, on a tracé deux courbes, dont l'une correspond à la moyenne des résultats fournis par les quatre expériences sur le bactériophage S 43, l'autre à la moyenne de deux expériences dans lesquelles le bactériophage C 16 a été irradié sans interposition de filtre. Malgré les imperfections de technique signalées plus haut, l'allure de ces courbes traduit très nettement la grande différence qui existe dans la radiosensi-

TABLEAU II.

NUMÉRO et condition de l'expérience	NOMBRE DE PLAGES (MOYENNE DE 2 OU 4 NUMÉRATIONS) après une durée d'irradiation de					
	0 minute (témoin)	2 minutes	4 minutes	7 minutes	10 minutes	14 minutes
<i>A. — Bactériophage dysentérique C16 (50-75 m<math>\mu</math>) :</i>						
1 (sans filtre) . .	400	280	475	400	42,5	9
2 (avec filtre) . .	+ 1 000			± 450	385	290
3 (avec filtre pour 14 min.) . .	+ 500		415		6	93
4 (avec filtre) . .	330		265	180	98,5	50
5 (avec filtre) . .	265		107,5	79		29
6 (avec filtre) . .	295	200		137		73
7 (avec filtre) . .	355	246,5	236	155		114,2
NUMÉRO et condition de l'expérience	NOMBRE DE PLAGES (MOYENNE DE 2 OU 4 NUMÉRATIONS) après une durée d'irradiation de					
	0 minute (témoin)	10 minutes	20 minutes	35 minutes	50 minutes	
<i>B. — Bactériophage dysentérique S13 (10-12 m<math>\mu</math>) :</i>						
1 (sans filtre) . .	180	445	125	81		80
2 (sans filtre) . .	375	310	200	92,5		67,2
3 (sans filtre) . .	250	215	215	152,5		105
4 (sans filtre) . .	300	232,5	137,5	100		85

bilité des deux bactériophages. Ces courbes moyennes se superposent de façon fort satisfaisante à celles (fig. 4) obtenues au cours de nouvelles expériences dans lesquelles on a cherché à éliminer les causes d'erreur signalées plus haut. Voici la technique que nous avons adoptée, après divers tâtonnements (42).

Comme précédemment, on établit, pour chacun des bactériophages étudiés, une dilution telle que 1 goutte fournit plu-

(42) L'irradiation des bactériophages à l'état de suspension soit en liquide physiologique, soit en bouillon dans des capsules de gélatine paraffinées donne des déboires. Dans le premier cas, les bactériophages se montrent fort instables à l'irradiation. Il en est de même, mais à un degré moindre dans le deuxième cas, les résultats présentant souvent des irrégularités dont la cause nous échappe.

sieurs centaines de plages en présence de la souche sensible correspondante. Cette dilution est faite en bouillon et répartie à raison de X gouttes par tube, au moyen d'une seule et même pipette, dans des tubes en verre très mince, légèrement coniques, dont l'extrémité supérieure élargie mesure environ 8 millimètres de diamètre et dans l'intérieur desquels le liquide occupe 1 centimètre de hauteur.. Les tubes ainsi préparés sont ensuite soumis à l'action des rayons X pendant des durées variables pour chacun des tubes.

I goutte de la dilution témoin (non irradiée), ainsi que de chaque échantillon irradié, est ensuite déposée à la surface de la gélose contenue dans des boîtes de Petri de 8 centimètres de diamètre et soigneusement étalée, 2 boîtes de Petri étant préparées avec chaque échantillon. Tous les prélèvements se font avec la même pipette Pasteur, en procédant de l'échantillon le plus fortement irradié à l'échantillon témoin. On obtient ainsi deux séries parallèles de boîtes, dont chacune reçoit, aussitôt après, I goutte de suspension épaisse de la souche bactérienne sensible correspondante. Après incubation, on procède à la numération des plages formées sur les 2 boîtes correspondant à chaque échantillon irradié, ainsi qu'au témoin non irradié. Cette numération a toujours été faite par deux observateurs indépendants, tantôt pour les deux séries de boîtes, tantôt séparément pour chaque série (43).

Voici les détails de quelques expériences effectuées, avec la technique qu'on vient de décrire, sur les bactériophages C 16 et S 13.

#### A. — Bactériophage C 16.

**EXPÉRIENCE 1.** — Dilution à  $10^{-5}$  en bouillon. Cette dilution est distribuée dans 3 tubes, à raison de X gouttes par tube, et irradiée respectivement pendant deux, sept et quatorze minutes avec une intensité correspondant à 6.500 r-minute (intensité mesurée à la surface du liquide). I goutte de chaque échantillon irradié, ainsi que de l'échantillon témoin, est déposée à la surface d'une gélose (à 1,1 p. 100) contenue dans des boîtes de Petri de 8 centimètres de diamètre (2 boîtes étant préparées pour chaque échantillon), et étalée aussitôt (une seule pipette Pasteur étant employée pour tous ces prélèvements). Tout de suite après, on étale à la surface de la gélose de chaque

(43) Nous tenons à adresser ici nos remerciements à notre collaborateur Paul Ducrest, dont le concours nous a été fort précieux au cours de ces recherches.

boîte I goutte de suspension épaisse de *B. dysentérique* Y 6 R. Après un séjour de dix-huit heures à l'étuve à 37°, on compte le nombre de plages produites, la numération étant faite pour toutes les boîtes par deux observateurs différents A et B.

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillons témoins (non irradiés).</i>	—	—	—
1	415	390	
2	420	400	
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Deux minutes . . . . .	1	320	300
	2	300	275
Sept minutes . . . . .	1	220	225
	2	210	210
Quatorze minutes . . . . .	1	170	165
	2	170	41

EXPÉRIENCE 2. — Même technique que ci-dessus, mais avec une gélose à 2,5 p. 100 ; il n'a été fait qu'une boîte pour chaque échantillon ;

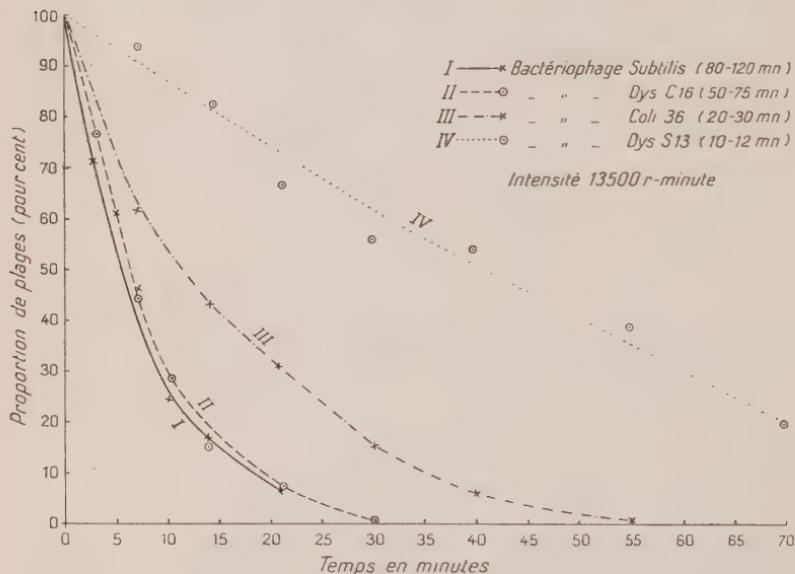


FIG. 4. — Résultats de l'irradiation (dans les mêmes conditions) de quatre bactériophages de tailles différentes ( $m\pi = m\mu$ ).

irradiation respectivement pendant sept et quatorze minutes ; intensité 15.000 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillon témoin . . . . .</i>	—	—	—
	380	375	
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Sept minutes . . . . .	185	180	48,4
Quatorze minutes . . . . .	60	60	15,9

EXPÉRIENCE 3. — La numération des plages de chaque série de plaques a été faite par deux observateurs différents (fig. 5 A).

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillon témoin</i> . . . . .	—	—	—
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Sept minutes . . . . .	160	135	57,8
Quatorze minutes . . . . .	70	80	29,4

EXPÉRIENCE 4. — Comme ci-dessus ; intensité 13.500 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillon témoin</i> . . . . .	—	—	—
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Trois minutes . . . . .	320	390	78
Sept minutes . . . . .	210	230	48,4
Dix minutes. . . . .	145	135	30
Quatorze minutes . . . . .	73	78	16,1
Vingt et une minutes . . . . .	32	37	7,5
Trente minutes . . . . .	2	1	0,3
Quarante minutes . . . . .	0	0	—

### B. — Bactériophage S 13.

EXPÉRIENCE 1. — La dilution de bactériophage S 13 (à  $\frac{10}{4}^{-2}$ ) est irradiée en tubes de gélatine paraffinés ; intensité 6.800 r-minute ; la numération des plages a été faite par deux observateurs différents pour les boîtes des deux séries.

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillons témoins</i> . . . . .	—	—	—
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Dix minutes . . . . .	1	295	260
	2	285	250
Vingt minutes . . . . .	1	235	240
	2	270	260
Trente-cinq minutes . . . . .	1	250	240
	2	265	230
Cinquante minutes . . . . .	1	170	180
	2	145	135

EXPÉRIENCE 2. — Comme ci-dessus (capsules de gélatine paraffinées) ; intensité 6.500 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
	—	—	—
<i>Echantillons témoins . . . . .</i>	{ 1      480      490	{ 2      495      520	
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Dix minutes . . . . .	{ 1      360      350	{ 2      345      335	{ 70
Vingt minutes . . . . .	{ 1      310      300	{ 2      380      360	{ 68,2
Trente-cinq minutes . . . . .	{ 1      215      210	{ 2      220      200	{ 42
Cinquante minutes . . . . .	{ 1      220      205	{ 2      165      160	{ 37

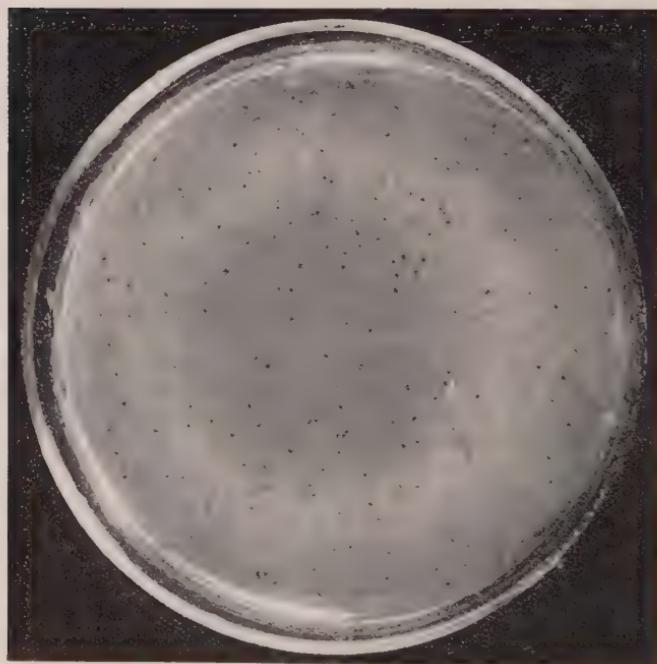


FIG. 5 A 1.

FIG. 5. — Irradiation (dans les mêmes conditions) d'un bactériophage dysentérique C16 (A) et d'un bactériophage staphylococcique S3K (B) de mêmes dimensions : 1, témoin; 2, irradié pendant sept minutes; 3, irradié pendant quatorze minutes.

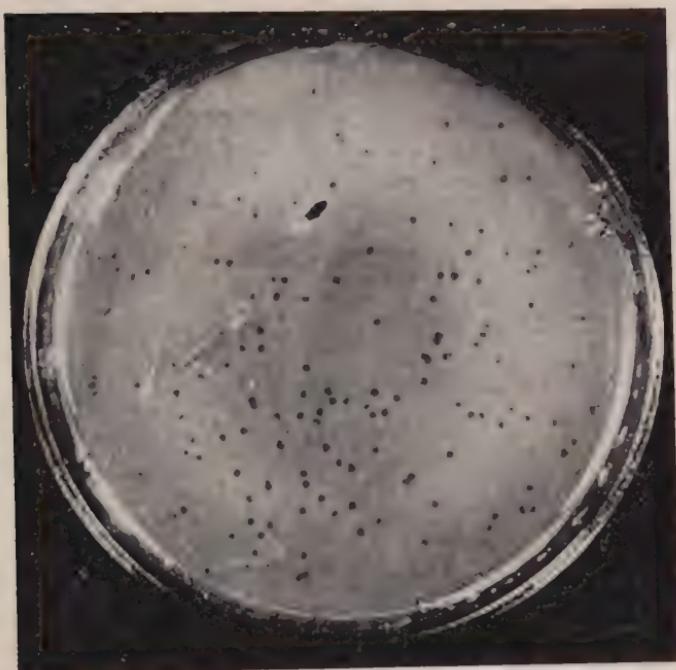


FIG. 5 A 2.



FIG. 5 B 3

EXPÉRIENCE 3. — L'irradiation est faite en tubes de verre mince ; intensité 6.500 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillons témoins . . . . .</i>	1	410	390
	2	450	420
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>	1	330	305
	2	300	280
<i>Quatre-vingt-dix minutes . . .</i>	1	265	240
	2	260	250

EXPÉRIENCE 4. — Comme ci-dessus ; la numération est faite par deux observateurs, les plages de chaque série étant relevées par un seul ; intensité 13.500 r-minute (Courbe IV, fig. 4 ; Planche II).

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillon témoin . . . . .</i>	385	380	—
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Sept minutes . . . . .	338	370	93,4
Quatorze minutes . . . . .	334	283	84,6
Vingt et une minutes . . . . .	229	270	65,6
Trente minutes . . . . .	230	195	55,5
Quarante minutes . . . . .	206	205	53,9
Cinquante-cinq minutes . . . . .	146	145	38,1
Soixante-dix minutes . . . . .	110	105	28,9

Les courbes II et IV (fig. 4) traduisent les résultats d'une expérience portant respectivement sur les bactériophages C 16 et S 43 ; elles montrent le pourcentage de plages fourni par chacun de ces bactériophages pour des irradiations d'intensité déterminée, c'est-à-dire la proportion de corpuscules de chaque bactériophage ayant résisté à des doses déterminées de rayons X. Ainsi que nous l'avons dit plus haut, ces courbes se superposent de façon satisfaisante aux courbes « moyennes » obtenues antérieurement avec une technique moins correcte (fig. 3, B). La radiorésistance élevée du bactériophage S 43 (10-12 m $\mu$ ), comparativement à celle du bactériophage C 16 (50-75 m $\mu$ ), se trouve ainsi définitivement établie.

#### 6° ETUDE DE LA RADIOSENSIBILITÉ DE DIVERS BACTÉRIOPHAGES.

Il était important de vérifier s'il s'agissait là d'un fait d'ordre général et traduisant une relation entre la taille des facteurs lysogènes et leur radiosensibilité.

Pour répondre à cette question, nous avons étendu nos recherches à plusieurs autres bactériophages appartenant à des groupes bactériens différents et dont les dimensions approximatives ont été, elles aussi, déterminées antérieurement au moyen de l'ultrafiltration et de l'ultracentrifugation. Dans toutes ces expériences, nous avons employé la technique précédemment décrite : irradiation en bouillon dans des tubes de verre très mince, tous les prélèvements étant effectués, au cours d'une expérience, au moyen de la même pipette. On trouvera ci-après les détails de quelques-unes de ces expériences.

A. — **Bactériophage Coli 36** (\*)  
( $d = 20$  à  $30$   $m\mu$ ). [Courbe III, fig. 4.]

Intensité 13.500 r-minute ; deux séries de boîtes, la numération des plages de chaque série étant faite par deux observateurs différents (A et B).

	A	B	PROPORTION p. 100
—	—	—	—
<i>Echantillon témoin</i> . . . . .	870	680	
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Trois minutes . . . . .	760	720	95,4
Sept minutes . . . . .	500	440	60,6
Quatorze minutes . . . . .	330	335	42,9
Vingt et une minutes . . . . .	230	255	31,2
Trente minutes . . . . .	125	102	14,6
Quarante minutes . . . . .	36	45	5,2
Cinquante-cinq minutes . . . . .	6	9	0,9

(\*) Gélose à 1,6 p. 100.

B. — **Bactériophage *Megatherium*** (\*\*)

( $d = 30$  à  $40$   $m\mu$  ultrafiltration), ( $d = 30$  à  $37$   $m\mu$  ultracentrifugation).

Intensité 15.000 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
—	—	—	—
<i>Echantillon témoin</i> . . . . .	525		
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Quatorze minutes . . . . .	197		37,6
Cinquante-cinq minutes . . . . .	4		0,7

(\*\*) Gélose à 2,5 p. 100.

C. — **Bactériophage staphylococcique S3K (\*\*)**  
 $(d = 50 \text{ à } 75 \text{ m}\mu, 60 \text{ à } 90 \text{ m}\mu)$ .

EXPÉRIENCE 1. — Intensité 6.500 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
	—	—	—
<i>Echantillons témoins . . . . .</i>	{ 1      605 2      585	585 540	
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Deux minutes . . . . .	{ 1      415 2      530	410 520	{ 80,9
Sept minutes. . . . .	{ 1      400 2      410	405 410	{ 69,7
Quatorze minutes . . . . .	{ 1      345 2      450	355 450	{ 66

(\*\*) Gélose à 1,6 p. 100.

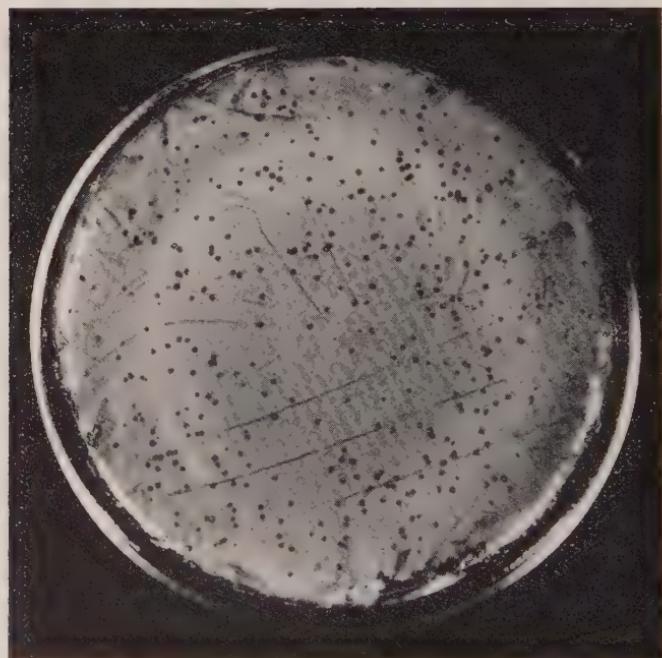


FIG. 5 B 1.



FIG. 5 B 2



FIG. 5 B 3

## EXPÉRIENCE 2. — (fig. 5 B).

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillons témoins</i> . . . . .	—	—	—
	430	390	
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Sept minutes . . . . .	225	190	50,6
Quatorze minutes . . . . .	170	130	36,5

## EXPÉRIENCE 3. — Intensité 15.000 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillon témoin</i> . . . . .	—	—	—
	385	385	
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Sept minutes . . . . .	155	175	42,8
Quatorze minutes . . . . .	36	45	11

D. — Bactériophage typhique T105  $\alpha$  (\*)  
( $d = 60$  à 90  $m\mu$ ).

## EXPÉRIENCE 1. — Intensité 6.500 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillons témoins</i> . . . . .	—	—	—
	1	390	400
	2	400	405
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Deux minutes . . . . .	1	380	350
	2	355	335
	—	—	89
Sept minutes . . . . .	1	230	240
	2	270	280
	—	—	63,9
Quatorze minutes . . . . .	1	225	255
	2	215	220
	—	—	57,3
Vingt-trois minutes . . . . .	1	115	115
	2	140	155
	—	—	32,9

(\*) Gélose à 4,6 p. 100.

## EXPÉRIENCE 2. — Intensité 15.000 r-minute

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Echantillon témoin</i> . . . . .	—	—	—
	1.240	1.210	
<i>Echantillons irradiés pendant :</i>			
Sept minutes . . . . .	710	700	56,7
Quatorze minutes . . . . .	170	160	13,4

E. — **Bactériophage *Subtilis***  
 $(d = 80 \text{ à } 120 \text{ m}\mu)$ . [Courbe I, fig. 4; Planche I,]

EXPÉRIENCE 1. — Intensité 13.500 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Échantillon témoin</i> . . . . .	—	—	—
<i>Échantillons irradiés pendant :</i>			
Trois minutes . . . . .	575	420	71
Cinq minutes . . . . .	460	300	60,7
Sept minutes . . . . .	330	324	46
Dix minutes . . . . .	160	180	24,2
Quatorze minutes . . . . .	109	133	17
Vingt et une minutes . . . . .	57	38	6,7

EXPÉRIENCE 2. — Intensité 15.000 r-minute.

	A	B	PROPORTION p. 100
<i>Échantillon témoin</i> . . . . .	—	—	—
<i>Échantillons irradiés pendant :</i>			
Sept minutes . . . . .	61	62	49,3
Quatorze minutes . . . . .	25	28	8,3
Vingt et une minutes . . . . .	5	3	1,2
Trente minutes . . . . .	0	0	0

Ces exemples suffisent à établir que la relation entre la taille et la radiosensibilité, mise en évidence par l'étude des bactériophages C 46 et S 13, est un phénomène général : la sensibilité des bactériophages aux rayons X varie dans le même sens que leurs dimensions. C'est ce qui ressort du tableau III, dans lequel on a figuré les proportions des différents bactériophages ayant résisté à une irradiation de même intensité : 13.500 r-minute en A et 15.000 r-minute en B.

Les données du tableau III B sont présentées graphiquement dans la figure 6. La relation entre la taille des bactériophages et leur radiosensibilité que nous venons d'établir en ressort avec une netteté particulière. On constate, en effet, que la proportion de corpuscules bactériophages ayant résisté à une irradiation d'une intensité donnée est d'autant plus faible que les dimensions des bactériophages sont plus grandes. Que les bactériophages soient rangés d'après leur

TABLEAU III.

BACTÉRIOPHAGES	PROPORTION D'ÉLÉMENTS (POUR CENT) ayant résisté à une irradiation de									
	3 minutes	5 minutes	7 minutes	10 minutes	14 minutes	21 minutes	30 minutes	40 minutes	55 minutes	70 minutes
<i>Groupe d'expériences A. — Intensité 13.500 r-minute.</i>										
Dysentérique S 13 (10 à 12 m $\mu$ ). . . . .	93,4	81,6	65,6	55,4	53,9	38,1				28,9
Coli 36 (20 à 30 m $\mu$ ). . . . .	95,4	60,6	42,9	31,2	14,6	5,2	0,9			
Dysentérique C 16 (50 à 75 m $\mu$ ). . . . .	76,3	47,3	30	16,1	7,5	0,3				
Subtilis (80 à 120 m $\mu$ ). . . . .	71	60,7	46	24,2	17	6,7				
BACTÉRIOPHAGES	PROPORTION D'ÉLÉMENTS (POUR CENT) ayant résisté à une irradiation de									
	7 minutes	14 minutes	55 minutes							
<i>Groupe d'expériences B. — Intensité : 15.000 r-minute.</i>										
Dysentérique S 13 (10 à 12 m $\mu$ ). . . . .		82,5 (1)								31,3 (1)
Coli 36 (20 à 30 m $\mu$ ). . . . .		63,4								1,9
Megatherium 899 (30 à 40 m $\mu$ ). . . . .			50,6 (1)							0,6
Typhique T 105 $\alpha$ (60 à 90 m $\mu$ ). . . . .	56,5 (1)		16,5 (1)							
Staphyl. S 3 K (50 à 75 m $\mu$ ). . . . .	42,6		11							
Dysentérique C 16 (50 à 75 m $\mu$ ). . . . .	48,4		15,9							
Subtilis (80 à 120 m $\mu$ ). . . . .	22,1 (2)		3,7 (2)							

(1) Moyenne de deux expériences.

(2) Moyenne de trois expériences.

radiosensibilité ou leurs dimensions, leur classement reste le même et semblable à celui que leur avaient assigné l'ultrafiltration et l'ultracentrifugation (tableau III B, colonne 1). Les deux séries ne diffèrent que par la place faite au bactériophage typhique T 105  $\alpha$ . Dans nos expériences, ce bactériophage s'est montré légèrement mais nettement plus résistant que les bactériophages dysentérique C 16 et staphylococcique S 3 K, alors que d'après Elford et Andrewes, les dimensions de ces deux derniers seraient un peu inférieures (50-75 m $\mu$  contre 60-90 m $\mu$  pour le bactériophage T 105  $\alpha$ ).

Cette légère différence pourrait bien n'être qu'apparente : les zones délimitées par les valeurs extrêmes sont en effet particulièrement étendues et empiètent largement l'une sur l'autre. Des recherches toutes récentes et extrêmement soigneuses d'Elford (44) lui-même montrent, qu'en tout état de cause, les dimensions des bactériophages T 105  $\alpha$  et S 3 K doivent être très voisines (68 m $\mu$  et 70-73 m $\mu$  respectivement) ; les

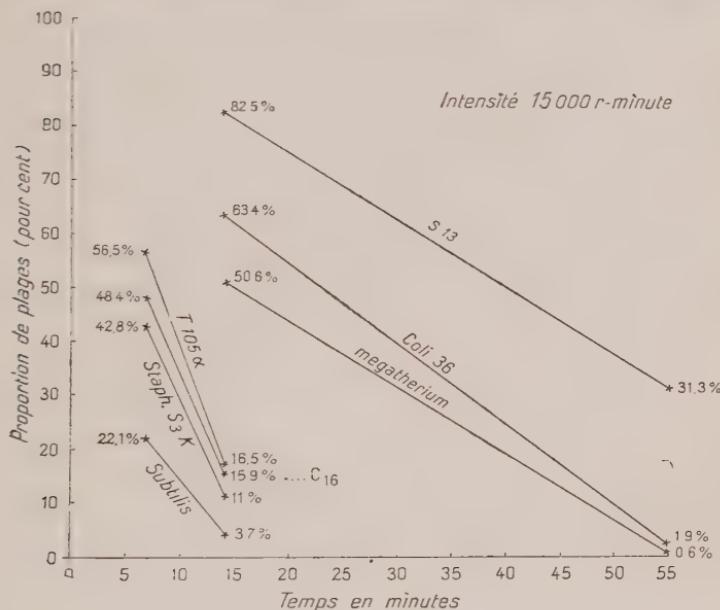


FIG. 6. — Résultats de l'irradiation (dans les mêmes conditions) de sept bactériophages de tailles diverses ; de gauche à droite : bactériophages *subtilis* S3 k, C16 T105 d, *megatherium*, *coli*, S13. —

Résultats des expériences d'irradiation indiquent peut-être le sens réel de la différence.

### Discussion et conclusions.

L'ensemble des données que nous venons de rapporter établit, sans doute possible, que la radiosensibilité des bactériophages est fonction de leurs dimensions et varie dans le

(44) Expériences inédites. Elford, in Doerr et Hallauer, *loc. cit.*, p. 208.

même sens que celles-ci. Dans la théorie quantique de l'action biologique des radiations, cette relation pourrait s'expliquer très simplement en admettant que, dans le cas des facteurs lysogènes, la « zone sensible » coïncide avec l'objet lui-même (45).

Le fait que l'action des rayons X assigne aux bactériophages les mêmes grandeurs relatives que les résultats de l'ultrafiltration et de l'ultracentrifugation est intéressant à plus d'un titre. Il y a là, tout d'abord, une confirmation précieuse, fournie par une méthode nouvelle et d'ordre tout différent, de la valeur des techniques actuelles de l'ultrafiltration et de l'ultracentrifugation telles qu'elles ont été fixées par les travaux d'Elford et de Schlesinger. Il résulte, d'autre part, du mécanisme même de l'action des rayons X, que les grandeurs ainsi déterminées correspondent à celles des éléments actifs eux-mêmes et non de supports inertes (Doerr, Bronfenbrenner).

La concordance remarquable des résultats obtenus au moyen de l'ultrafiltration et de l'ultracentrifugation d'une part, de l'irradiation d'autre part, nous autorise à conclure que celle-ci fournit un procédé nouveau, d'un maniement aisé, pour la détermination des dimensions relatives des bactériophages. Des recherches en cours doivent nous apprendre si l'action des rayons X permettra d'en déterminer directement les dimensions absolues (46). Dans la pratique, cette détermination peut être faite dès à présent indirectement. Il suffit de comparer les résultats obtenus par l'irradiation du bactériophage étudié avec ceux fournis, dans les mêmes conditions, par des facteurs lysogènes de dimensions connues. L'action des rayons X permet d'autre part de séparer, à partir d'un

(45) Ces données sur la radiosensibilité des bactériophages sont en bon accord avec l'hypothèse émise par Stanley, à propos des virus des « mosaïques », d'après laquelle l'élément virulent serait constitué par une seule molécule protéique, d'un poids très élevé.

(46) Les résultats actuellement acquis, et notamment le comportement à l'irradiation de bactériophages de même taille mais qui appartiennent à des groupes bactériens très différents (C 16, S 3 K; fig. 5) permettent d'affirmer que le rôle de facteurs autres que la taille peut être considéré comme négligeable dans les conditions de nos expériences.

mélange de facteurs lysogènes, le bactériophage le plus petit, c'est-à-dire le plus résistant. On peut enfin envisager l'extension de la nouvelle méthode à la détermination des dimensions d'autres agents infravisibles.

### PLANCHES I ET II

- I. *Bactériophage du B. subtilis* (80-120 m $\mu$ ). Durée de l'irradiation : 0, 3, 5, 10, 14, 21 minutes. Intensité : 13.500 r-minute.
- II. *Bactériophage dysentérique S13* (10-12 m $\mu$ ). Durée des irradiations : 0, 7, 21, 40, 55 et 70 minutes. Intensité : 13.500 r-minute.  
Les photographies ayant été faites pour S13 quelques jours après l'expérience, il y a une production abondante de cristaux dans la gélose.

# **SUR LA PRÉSENCE DES VIRUS RABIQUE ET PSEUDO-RABIQUE DANS LES MEMBRANES ET MILIEUX DE L'ŒIL**

par P. REMLINGER et J. BAILLY.

Des chiens, des chats ou des lapins ayant succombé à la rage à virus fixe (virus lyonnais et tangérois) ou à virus de rue ; à la maladie d'Aujeszky (virus hongrois ou tunisien) ; les membranes (répine, choroïde) ou les milieux transparents [humeur aqueuse, cristallin, humeur vitrée] (1) étaient émulsionnés finement dans l'eau physiologique et l'émulsion inoculée au lapin, soit sous la dure-mère, soit dans l'épaisseur des muscles de la cuisse, quelques gouttes étant presque toujours injectées simultanément dans la chambre antérieure. Les résultats obtenus ont été les suivants.

**RÉTINE.** — Dans la rétine qui n'est qu'un épanouissement du nerf optique, la présence des virus rabique et pseudo-rabique n'a rien que de très naturel. De fait, qu'elles aient été entreprises avec des virus rabiques fixes ou des virus de rue, presque toutes les expériences (9 sur 10) ont fourni un résultat positif. Le virus d'Aujeszky se rencontre dans la rétine avec une fréquence moindre. 13 expériences ont fourni 6 résultats positifs et 7 négatifs. Comment expliquer ces faits négatifs ?

Dans la maladie d'Aujeszky, l'hypothèse d'une infection mortelle auto-stérilisée (Levaditi) est difficile à admettre, car l'évolution de la maladie est si rapide que cette stérilisation ne doit pas avoir le temps de s'effectuer. Il est plus logique de supposer que la mort des animaux se produit parfois avant

(1) On connaît les beaux travaux de M. Levaditi et de M<sup>me</sup> Schœn sur la présence du virus rabique et des corps de Negri dans les cellules épithéliales de la cornée des lapins et des souris inoculés avec du virus de rue... Nous avons donc, intentionnellement laissé de côté la cornée.

que le virus n'ait pu se propager dans toute l'étendue du système nerveux périphérique et même central. Ceci explique du reste la négativité de certains passages alors que les animaux ont succombé après avoir présenté la symptomatologie la plus typique.

**CHOROÏDE.** — On sait d'une part combien la choroïde est riche en vaisseaux sanguins et d'autre part que, chez le lapin en particulier, le virus d'Aujeszky se rencontre dans le sang avant de pouvoir être décelé dans les centres nerveux. Il n'est donc pas surprenant que 9 expériences entreprises avec la choroïde d'animaux ayant succombé à la pseudo-rage aient fourni 8 résultats positifs et 1 seul négatif. Le virus rabique, par contre, ne se trouve pas dans le sang ou ne s'y rencontre qu'à titre exceptionnel. De fait, 8 expériences, entreprises avec la choroïde, ont fourni 4 résultats négatifs et 4 positifs, ces derniers en rapport très vraisemblable avec le riche plexus ganglionnaire choroïdien dont les rameaux viennent se perdre dans la tunique musculaire des vaisseaux de la membrane.

**CORPS VITRÉ.** — Si aucune précaution spéciale n'est prise pour l'extraction du corps vitré, il est fatal que quelques flocons de pigment noir choroïdien se trouvent incorporés au liquide. C'est donc un mélange de corps vitré et de pigment choroïdien qui est inoculé aux animaux. 7 expériences, entreprises dans ces conditions chez des animaux rabiques, ont donné 4 résultats positifs et 3 négatifs. 4 expériences sur des animaux ayant succombé à la maladie d'Aujeszky ont donné 3 résultats positifs et 1 négatif. Nous étant avisés de ce que ces traces de pigment pouvaient, quoique très minimes, constituer une cause d'erreur, nous avons évité celle-ci, au cours d'une deuxième série de recherches, en prélevant l'humeur vitrée à l'aide d'une pipette introduite après ablation du cristallin dans le centre de la masse. 16 expériences, moyennant ces précautions chez des animaux ayant succombé à la maladie d'Aujeszky, ont donné 16 résultats négatifs. Au contraire, 5 expériences sur des animaux morts de rage ont donné 2 résultats positifs et 3 négatifs. Le

corps vitré est donc susceptible de renfermer par lui-même du virus rabique.

**CRISTALLIN.** — Le cristallin ne possédant aucun filet nerveux, non plus du reste qu'aucun vaisseau sanguin, il était à présumer que la recherche du virus rabique fournirait un résultat négatif. De fait, sur 10 expériences ayant porté sur des cristallins de lapin ou de chien, sur des virus fixes ou de rue, 9 ont été négatives. L'épisode suivant est très caractéristique à cet égard.

**EXPÉRIENCE 1.** — Du 8 au 30 avril, un même lapin reçoit dans les muscles cruraux l'émulsion dans l'eau physiologique des cristallins de 20 lapins (40 cristallins, 100 cent. cubes d'émulsion) ayant succombé au cours du mois à des rages à virus de rue. L'animal est demeuré vivant et bien portant.

Une dixième expérience, entreprise, il est vrai, avec un virus roumain particulièrement agressif, a fourni un résultat positif et celui-ci est d'autant plus surprenant que pour éviter la contamination à la rigueur possible par des neurones rabiques provenant de la zone de Zinn, des précautions spéciales avaient été prises.

**EXPÉRIENCE 2.** — Le 2 mai, un lapin ayant succombé à un virus de rue roumain particulièrement agressif, un cristallin est extrait après ablation de la cornée et iridectomie large. Il est déposé sur sa face postérieure sur un buvard et débarrassé à l'aide de la pince de la capsule cristalline qui, chez le lapin, offre peu d'adhérence avec le tissu propre. A l'aide d'un emporte-pièce de 3 millimètres de diamètre, agissant dans l'axe optique, dans une région sur laquelle la zone de Zinn ne s'étend pas, on découpe un boudin qui, après émulsion dans 1/2 cent. cube d'eau physiologique, est inoculé sous la dure-mère d'un lapin. Le 6 mai (quatrième jour), l'animal est trouvé le matin la tête tombante par paralysie des muscles de la nuque. Au cours de la journée, la paralysie se généralise et la maladie revêt la forme de la rage paralytique classique. Le lendemain, l'animal est étendu sur le côté, complètement paralysé. Mort le 8 (sixième jour). Passages positifs.

16 expériences ont été pratiquées avec des cristallins d'animaux ayant succombé à la maladie d'Aujeszky. Que ces cristallins aient été émulsionnés dans l'eau physiologique tout entiers, c'est-à-dire sans tenir compte de la possibilité de la contamination de l'émulsion par des neurones infectieux provenant de la zone de Zinn, ou qu'on se soit tenu à l'abri de la cause d'erreur que ces neurones étaient susceptibles de constituer, tous les résultats obtenus ont été négatifs.

HUMEUR AQUEUSE. — 18 expériences ont été pratiquées avec l'humeur aqueuse d'animaux ayant succombé à la maladie d'Aujeszky. Le résultat a toujours été négatif. Celui-ci a même été observé lorsque l'humeur aqueuse de plusieurs et parfois d'un nombre élevé d'animaux était inoculée à un même lapin. Il nous suffira de résumer l'expérience suivante très typique à cet égard.

EXPÉRIENCE 3. — Du 30 mars au 6 avril, l'humeur aqueuse de 10 lapins, d'un chien et d'un chat ayant succombé à la maladie d'Aujeszky est inoculée dans l'épaisseur des muscles cruraux d'un même lapin. Au total, l'animal a reçu 5 c. c. 1 d'humeur aqueuse de lapin ; 0 c. c. 8 d'humeur aqueuse de chien et 0 c. c. 7 d'humeur aqueuse de chat. Il n'a pas présenté le moindre phénomène morbide.

Les mêmes résultats négatifs ont été observés dans les expériences ayant porté sur l'humeur aqueuse des animaux morts de rage et cette question nous retiendra quelque peu. Babès (2), en effet, aurait, « en 1887, constaté dans plusieurs cas la virulence de l'humeur aqueuse des lapins de passage pendant leur vie ». MM. J. Courmont et J. Nicolas (3) ont avancé d'autre part que l'inoculation sous-dure-mérienne de l'humeur aqueuse des lapins devenus enragés à la suite de l'inoculation intra-cérébrale de virus fixe déterminait la rage dans près de la moitié des cas (7 expériences : 4 positives, 3 négatives). Ces résultats n'ont, à notre connaissance, jamais été contestés et l'existence du virus rabique dans l'humeur aqueuse est universellement admise. Nous avons fait porter une première série de recherches sur le lapin (26 observations) et sur le chien (22 observations), celui-ci étant atteint de rage clinique (7 fois) ou expérimentale (15 fois) ; sur les virus fixes de Lyon (23 observations) ou de Tanger (16 observations) ainsi que sur des virus de rue marocains plus ou moins agressifs (9 observations). A travers une pointe de cautère appliquée sur la cornée, on ponctionnait la chambre antérieure. La totalité de l'humeur aqueuse d'un œil et, le plus souvent, des deux yeux était ainsi prélevée soit aussitôt après

(2) BABÈS. *Traité de la Rage*, Paris, 1912, p. 272.

(3) J. COURMONT et J. NICOLAS. *Soc. de Biologie*, 12 décembre 1903, p. 1595.

la mort, soit — afin de favoriser la diffusion du virus — plusieurs heures après le décès et la totalité du liquide inoculée soit au lapin sous la dure-mère (26 observations), soit au cobaye ou dans le cerveau (10 observations) ou dans les muscles cruraux (12 observations). Même lorsque l'humeur aqueuse était enrichie du produit de raclage de la membrane de Descemet (14 observations), même lorsque les yeux étaient extraits de l'orbite sans précautions, lavés à grande eau et maniés brutalement au point qu'un peu de pigment irien passait dans l'humeur aqueuse (3 observations) et qu'étaient réalisées en outre les conditions les plus favorables à l'obtention d'un résultat positif (virus de rue très agressif ; prélèvement longtemps après la mort ; inoculation sous-dure-mérienne d'une grande quantité de liquide..., etc.), jamais le moindre symptôme morbide n'a été observé. Tous les animaux inoculés (26 lapins, 22 cobayes) ont survécu.

Dans une deuxième série d'expériences, des quantités massives d'humeur aqueuse ont été inoculées au cobaye dans les conditions suivantes.

**EXPÉRIENCE 4.** — Du 14 mars au 25 avril, un même cobaye reçoit alternativement dans les muscles cruraux droits, gauches ainsi que dans les muscles de la nuque, la totalité de l'humeur aqueuse des lapins ayant succombé à l'Institut Pasteur de Tanger à la rage à virus de rue (souches diverses). La quantité d'humeur aqueuse ainsi injectée atteint 15 c. c. 8 (28 inoculations). L'animal est demeuré vivant et parfaitement portant.

**EXPÉRIENCE 5.** — Du 15 mars au 17 avril, un même cobaye reçoit alternativement dans les muscles cruraux droits, gauches ainsi que dans les muscles de la nuque, la totalité de l'humeur aqueuse des chiens et des lapins ayant succombé à la rage déterminée par le virus fixe de Lyon. L'animal reçoit ainsi 8 c. c. 80 d'humeur aqueuse de chien (5 chiens) et 10 c. c. 65 d'humeur aqueuse de lapin (23 lapins), soit, au total, 19 c. c. 45 d'humeur aqueuse. Il est demeuré vivant et parfaitement portant.

**EXPÉRIENCE 6.** — Du 17 au 28 mars, un même cobaye reçoit alternativement dans les muscles cruraux droits, gauches ainsi que dans les muscles de la nuque, la totalité de l'humeur aqueuse des chiens et des lapins ayant succombé à la rage déterminée par le virus fixe de Tanger. Au total, 14 cent. cubes d'humeur aqueuse de chien (8 chiens) et 2 c. c. 5 d'humeur aqueuse de lapin (5 lapins) ont été ainsi inoculés. Le cobaye est demeuré vivant et bien portant.

Quelle peut être la cause des divergences dans les résultats obtenus par d'autres expérimentateurs et par nous-mêmes au sujet de cette existence du virus rabique dans l'humeur aqueuse ? C'est, croyons-nous, à l'envahissement précoce des membranes et des milieux transparents de l'œil par des microbes d'infection agonique et cadavérique qu'il faut demander l'explication du fait. Chez les animaux comme chez l'homme, la mort est rapidement suivie de phénomènes oculaires qui, depuis longtemps, ont fixé l'attention. L'œil perd son éclat ; la cornée, sa transparence ; le globe oculaire, sa tonicité..., etc. Dans ces conditions, à ce qu'aussitôt après le décès et déjà même pendant les dernières heures de la vie, les membranes et milieux de l'œil soient envahis par des microbes d'infection agonique et cadavérique, il ne saurait y avoir matière à surprise. Les recherches de M. Klodnitsky (4) sur cette question n'avaient porté que sur l'homme. Les nôtres (5) ont porté sur 67 lapins, 18 chiens, 5 chats ayant succombé principalement à la rage et à la maladie d'Aujeszky. 364 enseignements ont fourni 278 résultats positifs (76 p. 100) contre 86 négatifs (23 p. 100), les infections sévissant au maximum sur la choroïde et la rétine (résultats positifs 92 p. 100 et 88 p. 100), le cristallin et le corps vitré venant ensuite (82 p. 100 et 78 p. 100) et l'humeur aqueuse fournit des résultats sensiblement inférieurs (41 p. 100), vraisemblablement parce que, pour l'envahir, les microorganismes doivent passer à travers les fines lacunes du ligament pectiné très difficilement perméable. Ces microorganismes d'infection agonique ou cadavérique oculaire appartiennent à des espèces très variées. Inoculés avec l'humeur aqueuse, certains d'entre eux doués — tels le colibacille ou le staphylocoque — d'un pouvoir pathogène peu marqué mais bien réel, sont susceptibles de déterminer chez les animaux, chez le lapin en particulier, après une incubation de quelques jours, voire de quelques semaines des phénomènes paralytiques ou pseudo-paralytiques pouvant en imposer pour la rage. En supposant

(4) KLODNITSKY. *Revue de Path. comparée*, octobre 1938, p. 1119-1128.

(5) REMLINGER (P.) et BAILLY (J.). *Bull. Acad. de Médecine*, 23 mai 1939, p. 699-703.

qu'ils soient pratiqués, les passages ne permettent pas toujours de reconnaître d'emblée l'erreur sur le point d'être commise. Dans une de nos expériences, il n'a pas fallu moins de 3 de ces passages pour qu'on puisse, avec certitude, conclure à l'absence de virus dans une humeur aqueuse. C'est de ce côté qu'il faut chercher, croyons-nous, la cause des résultats positifs obtenus par quelques auteurs.

#### CONCLUSIONS.

1° Le virus rabique est susceptible de se rencontrer à la fois dans la rétine, la choroïde, le corps vitré et — mais à titre exceptionnel (virus renforcé) — dans le cristallin ;

2° C'est uniquement de la choroïde et de la rétine qu'il est possible d'isoler le virus d'Aujeszky ;

3° Le virus rabique se rencontre presque constamment dans la rétine ; le virus d'Aujeszky presque constamment dans la choroïde alors que c'est dans la moitié des cas seulement que le virus d'Aujeszky peut être isolé de la rétine et le virus rabique de la choroïde ;

4° Ni le virus rabique, ni le virus d'Aujeszky ne se rencontrent dans l'humeur aqueuse. Un syndrome paralytique ou pseudo-paralytique susceptible d'être réalisé par des microbes d'infection agonique ou cadavérique inoculés au cours des expériences explique vraisemblablement les résultats positifs obtenus par quelques auteurs avec l'humeur aqueuse des animaux rabiques.

# **ACTION DU RAYONNEMENT RADIOACTIF SUR LA MULTIPLICATION ET SUR LA STRUCTURE DES MICROORGANISMES**

par S. METALNIKOV et A. YAKIMACH.

La modification expérimentale des caractères héréditaires et la formation de nouvelles mutations et de nouvelles races font partie du grand problème que pose la création de nouvelles formes de vie.

C'est à un savant russe, Nadson, que nous devons les premières notions intéressant l'action du rayonnement radioactif sur les levures et quelques autres microorganismes. C'est lui qui, en 1920, a établi qu'il est possible de produire par ces rayons des modifications héréditaires très stables se transmettant de génération en génération pendant une période de temps prolongée.

En 1927 et les années suivantes, le savant américain, Muller, a réalisé ses célèbres expériences sur les mutations des mouches drosophyles soumises à l'influence des rayons radioactifs.

De nombreux savants ont vérifié et complété les expériences effectuées sur les Drosophyles, sur les plantes et sur les animaux, néanmoins c'est principalement à Nadson et à ses nombreux élèves que nous devons nos premières connaissances en ce qui concerne l'action des rayons radioactifs sur les microorganismes.

Dès 1920 cet auteur a établi que l'effet produit par l'action des rayons radioactifs se transmet, chez les microorganismes, par voie héréditaire, de génération en génération. D'ordinaire cet effet ne se manifeste pas immédiatement, mais au bout de quelque temps après l'irradiation ; c'est ce qu'on appelle la période latente de l'action des rayons.

Il ne faut jamais perdre de vue que les cultures pures n'ont qu'une valeur relative, car toute culture pure se modifie très

fortement avec le temps, elle ne reste jamais la même. Outre une dégénérescence générale causée par des conditions défavorables, il se produit en elle une dissociation microbienne et la superposition à une ancienne forme d'une nouvelle race « saltante ».

N'est-il pas possible de modifier la structure et la virulence des microorganismes à un tel point qu'il serait possible de préparer, par cette méthode, des vaccins vivants d'une virulence croissante ? Voilà la question qui éveilla notre intérêt dès le début de ces recherches.

Nous avons alors entrepris de nombreuses expériences sur différents microbes : sarcines, bacilles tuberculeux, bacilles typhiques, vibron cholérique, charbon, bacilles des vers roses, etc., en commençant par les sarcines que nous avons isolées d'insectes malades. Celles-ci sont plus grandes que les sarcines ordinaires et de couleur jaune.

La technique de nos expériences est très simple : Nous avons utilisé du Radon en tubes capillaires de verre que nous introduisons dans des tubes à essai avec un bouillonensemencé de microbes cultivés sur gélose.

Mais ici il nous faut dire quelques mots sur les tubes capillaires que nous utilisons dans nos recherches.

Les tubes capillaires sont chargés d'émanation de Radium à l'aide d'un appareil qui se compose de deux parties comprenant chacune une pompe à mercure. La première partie sert à l'extraction du Radon et à sa purification ; la seconde sert à sa compression dans les tubes capillaires.

Par pompages successifs avec la pompe à mercure en relation directe avec la solution de Radium enfermée dans un coffre garni de plomb, on envoie l'émanation dans l'appareil destiné à sa purification. Lorsque celle-ci est obtenue, l'émanation est repompée par une seconde pompe à mercure qui l'envoie dans les tubes capillaires où elle est comprimée. Il ne reste plus qu'à couper au chalumeau le tube capillaire qui contient l'émanation.

Nous avons pu utiliser les tubes capillaires aussi bien pour des doses faibles (0 m. c. 37, 0 m. c. 53, etc.), que pour des doses très fortes d'émanation (80 m. c. et plus). L'émanation

radioactive traversant le verre disparaît assez rapidement : on en perd 15 p. 100 en vingt-quatre heures, et c'est ainsi qu'en une semaine on perd la presque totalité du Radon contenu dans le tube.

Voici la description d'une de nos expériences :

Nous introduisons des doses croissantes de Radon dans 4 tubes de bouillon ensemencés par des sarcines.

Dans le tube I nous introduisons 0 m. c. 34.

Dans le tube II nous introduisons 0 m. c. 37.

Dans le tube III nous introduisons 0 m. c. 53.



Dans le tube IV nous introduisons 81 m. c. 5.

Les tubes V et VI servent de contrôle.

Nous plaçons tous ces tubes dans une étuve à 35-37°. Après deux, quatre, dix et vingt jours nous étudions les résultats.

Tandis que dans les tubes I, II, III qui contiennent des doses croissantes de Radon, l'émulsion devient de plus en plus dense par comparaison avec les tubes de contrôle V et VI ; dans le tube IV qui contient une dose très forte de Radon, la multiplication est insignifiante. Nous en pouvons conclure que les doses faibles de Radon stimulent la multiplication des microbes alors que les doses fortes l'atténuent et même tuent la culture.

Nous voyons également que l'action du rayonnement radioactif s'exerce non seulement sur la multiplication des microbes, mais aussi sur leur structure.

Nous donnons ci-contre un dessin de sarcines normales et de sarcines ayant subi l'action du rayonnement radioactif.

La figure démontre clairement les grands changements réalisés par cette action sur leur structure.

De plus, à côté des sarcines normales, nous avons trouvé sur nos préparations microscopiques des microcoques et d'innombrables bâtonnets de différentes structures et dimensions.

Nous avons repris les mêmes expériences avec des cultures sur gélose.

Après avoir ensemencé les sarcines sur la gélose, nous avons introduit dans les tubes à essai des tubes capillaires contenant du Radon.

Dans le tube I, nous introduisons 80 m. c. de Radon.

Dans le tube II, nous introduisons 40 m. c. de Radon.

Dans le tube III, nous introduisons 5 m. c. de Radon.

Nous avons placé les trois tubes à essai à l'étuve à 35-37°. Après cinq à dix jours nous avons constaté que dans le tube I l'action produite par le Radon était beaucoup plus forte que dans les tubes II et III qui contenaient beaucoup moins de Radon. Mais ce qui est intéressant, c'est qu'aux deux extrémités du tube capillaire la couche de microbes était plus épaisse que le long du tube, ce qui prouve bien que les petites quantités de Radon qui sortent aux extrémités stimulent la multiplication des microbes.

En étudiant les préparations microscopiques, nous avons constaté que l'action du Radon sur la gélose est moins sensible que dans le bouillon. Nous avons pu démontrer néanmoins que les sarcines subissent des transformations très typiques. On pourra s'en faire une idée d'après le dessin que nous donnons des différents microorganismes que nous avons trouvés sur de nombreuses préparations.

Après avoir subi l'action du rayonnement radioactif, nous voyons d'abord que les cubes des sarcines se désagrègent et se transforment en grands et petits microcoques. Ces microcoques restent isolés ou donnent des diplocoques et des chaînettes ressemblant beaucoup aux streptocoques. On peut ensuite voir des microcoques s'allonger et se transformer en une quantité innombrable de bâtonnets de dimensions et de structures différentes. Les uns ressemblent aux microbes les plus petits qu'on puisse trouver dans la nature, tels que ceux de la peste, de la dysenterie, de la coqueluche, du choléra, etc., .

les autres beaucoup plus grands ont l'aspect du *B. megatherium*, des bacilles du tétanos, du charbon, etc.

A côté de ces microbes, nous avons trouvé une quantité de microorganismes jusqu'ici inconnus, qui se présentent souvent sous la forme de boules ou de gros bâtonnets courbés contenant une, deux ou plusieurs vacuoles transparentes, ou en chaînes ramifiées d'épingles, d'épaulettes, soit sous formes qui se terminent par des renflements qui ont l'aspect d'une spore terminale.

Cependant, nous avons pu isoler, par la dissociation microbienne plusieurs mutations stables que nous avons pu conserver jusqu'à présent. C'est ainsi que nous avons obtenu plusieurs races nouvelles : races jaune clair, crème, rose, brune, orange, etc. En les réensemencant nous avons pu constater que ces races conservaient leur tendance à produire des mutations. Quelquefois nous avons vu l'apparition sur une race crème ou jaune des taches et des formations originales roses ou rouges, ou oranges. En réensemencant ces taches sur la gélose nous avons obtenu toute une série de races nouvelles, qui conservent toujours leur tendances vers de nouvelles mutations.

Les mêmes expériences ont été reprises avec des bacilles tuberculeux et quelques autres microbes. Après avoirensemencé les bacilles tuberculeux sur pomme de terre, nous avons introduit dans la culture un tube capillaire contenant 75 m. c. de Radon. Après quatre à cinq semaines, nous avons trouvé que des petites colonies de bacilles tuberculeux s'étaient formées des deux côtés du tube capillaire, cependant qu'aux extrémités de ce tube, où l'action du Radon est moins forte, les bacilles tuberculeux se sont formés en couches très épaisses.

En étudiant sur les préparations microscopiques les bacilles tuberculeux, nous avons pu constater que ceux des extrémités du tube capillaire n'ont pas changé leur structure. Au contraire, ceux pris à côté et à quelque distance du tube capillaire ont subi quelques déformations.

MM. H. Olivier et P. Bonet-Maury ont démontré récemment que l'action des rayons radioactifs diminuent la virulence des bacilles tuberculeux.

Il ne faut pas perdre de vue que les cultures pures n'ont qu'une valeur relative. Il est bien connu que les cultures qui restent longtemps dans les milieux ou à l'étuve à 35-37° peuvent subir différentes modifications et des mutations.

Nadson a pu obtenir des formations nouvelles sous l'influence des facteurs physiques et chimiques, tels que le froid, la température superoptima, sels de calcium, chloroforme, cyanure de potassium, etc. Il a démontré aussi qu'il est possible de provoquer l'apparition de mutations et de races nouvelles non seulement sous l'influence des facteurs chimiques, mais aussi de facteurs biologiques, tels que la symbiose. Ainsi, d'après les recherches de N. Saenko, faites au laboratoire, les levures *Saccharomyces apiculatus* en culture combinée avec les levures de vin (*Saccharomyces ellipsoideus*) donnent naissance à de nouvelles races. De même le bacille mycoïde sous l'influence de *Proteus vulgaris* vivant en symbiose a fourni des races nouvelles stables.

Metchnikoff a été un des premiers qui aient attiré l'attention sur le polymorphisme que présentent les bacilles tuberculeux aviaires dans les milieux de culture. En effet il a signalé dans les vieilles cultures la présence d'un polymorphisme extraordinaire. Nocard et Roux et beaucoup d'autres auteurs à leur suite firent la même constatation.

On sait actuellement que les microbes peuvent changer de structure sous l'influence des conditions extérieures. Le milieu nutritif et tous les changements qui se produisent dans ce milieu pendant la multiplication des microbes (température, éclairage, rayons radioactifs et beaucoup de facteurs encore inconnus) ont sûrement une influence très active sur la vie et la structure des microbes.

Il est curieux de noter que les expériences ne réussissent pas toujours. Les nouvelles mutations sont souvent si faibles au début que, si on ne les isole pas rapidement, elles peuvent être surpassées par d'autres formes plus fortes. Comme nous l'avons démontré, les doses de rayons radioactifs jouent un rôle très important. Les doses assez fortes de Radon empêchent et même arrêtent la multiplication des microbes. Mais il y a des doses qui, au contraire, stimulent et réveillent dans

l'organisme les forces créatrices, qui sont capables de modifier les caractères physiologiques et même la structure des microbes.

Toute l'individualité se modifie à chaque instant et ne reste jamais la même. Chaque mouvement, chaque manifestation de l'organisme vivant, chaque instant de la vie laisse son empreinte et modifie relativement toute la structure matérielle. Quant à l'essence de la vie, elle ne se résume non seulement dans la structure matérielle, mais dans le processus vital ininterrompu, dans l'infini torrent de la vie, qui roule ses flots d'un individu à l'autre sans arrêt, sans fin, éternellement.

On peut dire que chaque organisme se hâte de vivre et de changer sa structure sous l'influence des rayons radioactifs et des conditions défavorables.

Il s'agit ici d'une sorte de défense organique contre la mort. En sentant le danger, l'organisme exalte ses forces créatrices et provoque la formation de différentes mutations et races qui pourraient mieux s'adapter aux conditions d'existence.

#### BIBLIOGRAPHIE

- [1] METCHNIKOFF (E.). *Virchov. Arch.*, **113**, 1888, 63.
- [2] NADSON (G.). *Ann. Röntg. et Radiol.*, Petrograd, 1920.
- [3] NADSON (G.) et PHILIPOV. *C. R. Soc. Biol.*, **93**, 1925, 473.
- [4] NADSON (G.). *Changement des caractères héréditaires et création de nouvelles races stables*. Editeur Hermann, Paris, 1937.
- [5] LACASSAGNE (A.) et PAULIN (A.). *C. R. Soc. Biol.*, **92**, 1930, 333.
- [6] BORDET (J.) et RENAUD (E.). *Ces Annales*, **45**, 1930, 1.
- [7] IMSHENECKIY (A.). *Bull. Acad. Sc. de U.R.S.S.*, 1932, 578.
- [8] NADSON (G.) et ROCHLINA (E.). *Ann. Arch. f. Microbiologie IV*, 1933, 189.
- [9] NADSON (G.) et ROCHLINA (E.). *Ann. Radiologie Leningrad* **13**, 1934, 23.
- [10] OLENOV (J.). *Zentralbl. f. Bacteriol.*, **92**, 1935, 165.
- [11] OLENOV (J.). *Institut de Röntgenologie et Radiologie de Leningrad*. Session annuelle 1935, 255.
- [12] PROUZANSKAYA. *C. R. Acad. Sc. de U.R.S.S.* **3**, 1934, 461.
- [13] SAENZ (A.). *Ces Annales*, **61**, 1938, 662.

- [14] VAN DEINSE et M<sup>lle</sup> HOOGHIERMSTER. *C. R. Soc. de Biol.*, **128**, 1938, 243.
- [15] METALNIKOV (S.), YAKIMACH (A.) et YADOFF (O.). *C. R. Acad. Sc.*, **208**, 1939, 605.
- [16] METALNIKOV (S.), YAKIMACH (A.) et YADOFF (O.). **208**, 1939, 1692.
- [17] OLIVIER (H.-R.) et BONET-MAURY (P.). *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, 301.
- [18] NASTA (M.) et LUPASCH (L.). *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, 1008.
- [19] MAXIM (M.). *Zeitschr. Tub.*, **81**, 1938, 155.

ÉTUDE SUR LA SÉROTHÉRAPIE PRÉVENTIVE  
ET CURATIVE  
DE LA PASTEURELLOSE DES BŒUFS ET DES BUFFLES

par H. JACOTOT.

(*Instiitut Pasteur de Nhatrang [Indochine].*)

C'est en 1885 que Kitt décrivit l'agent de la pasteurellose du bœuf, *Pasteurella bovisepctica* ; deux ans plus tard, Oreste et Armani isolaient le même germe de l'organisme de buffles morts de barbone.

Schein, le premier, en 1902, essaye de préparer un sérum contre la pasteurellose bovo-bubaline ; il fait à un bœuf des inoculations intraveineuses massives de culture microbienne ; mais le sérum qu'il obtient n'est « guère préventif et nullement curatif ».

En 1903, Blin et Carougeau s'adressent au cheval ; les chargements au moyen de cultures de *P. bovisepctica* déterminent fréquemment des accidents graves, voire mortels chez cet animal qui, de ce fait, se prête mal à la préparation du sérum.

En 1905, Di Giaxa et Di Donna expérimentent le sérum de lapin ; le procédé ne pouvait être que d'une portée réduite.

En 1909, Holmes signale qu'il a obtenu des résultats imparfaits de l'emploi du sérum préparé par injection sous-cutanée de microbes ; il préférerait un sérum antitoxique.

En 1914, Tarentino observe que le sérum d'âne hyperimmunisé confère une certaine résistance.

En 1921, Doyle revient au sérum de bœuf et, en 1927, Haler s'adresse au buffle ; il signale que chez cet animal l'injection intraveineuse peut donner lieu à de la polyarthrite ; les injections sous-cutanées de culture en bouillon Martin seraient susceptibles de provoquer des désordres locaux importants.

Nous avons commencé en 1925 une série de recherches en

vue de préparer chez le bœuf un sérum d'activité élevée contre la pasteurellose bovo-bubaline ; voici, résumés, les résultats de nos premiers essais de sérothérapie préventive et curative, essais dont l'exposé a été fait en 1927 (1).

a) Les essais de prévention réalisés sous des modalités diverses ont porté sur 38 veaux âgés d'un an à dix-huit mois, indépendamment des témoins d'épreuves ; 33 de ces veaux ont résisté à l'inoculation de virus pratiquée dans les trois semaines consécutives à l'injection de sérum ; la proportion d'animaux efficacement protégés a donc été de 87 p. 100.

b) Cinq essais de traitement ont été effectués sur des veaux ; les sujets ont reçu le sérum à haute dose mais, comme on peut en juger par le comportement des témoins, alors que la maladie expérimentale avait effectué plus de la moitié de son évolution ; dans ces conditions sévères 2 malades sur 5 ont guéri.

Nous avons poursuivi l'étude expérimentale de ce sérum ; elle autorise à présent des conclusions assez précises et qui sont en accord avec les résultats que l'emploi du produit a donnés dans la pratique courante en Indochine ; nous exposons donc maintenant les recherches effectuées depuis la publication du travail précité.

### Préparation du sérum.

Parmi les animaux utilisables pour la préparation du sérum contre la pasteurellose bovo-bubaline, buffles, bœufs, chevaux, c'est le bœuf que nous employons. Le cheval est d'une telle sensibilité aux injections successives de culture virulente qu'on ne peut lui injecter plus de 2 cent. cubes par la voie hypodermique, et, même dans ces conditions, on n'évite pas toujours des accidents, immédiats ou lointains. Quant au buffle, il est peu maniable.

Les bœufs destinés à la production du sérum sont préparés de la manière suivante :

(1) *Arch. Inst. Pasteur d'Indochine*, n°s 5-6, 1927, p. 1.

On choisit avec soin des bœufs encore jeunes, dont l'état général ne laisse rien à désirer; on s'assure que leur muqueuse buccale ne présente aucune lésion (ulcération dentaire) et qu'ils n'ont pas de parasites intestinaux.

On inocule la pasteurellose à un veau ; on sacrifie l'animal *in extremis* par saignée totale, on recueille son sang qu'on laisse coaguler ; on prélève la substance de l'œdème qui s'est développé au point d'inoculation, la rate, le foie, les reins ; par broyage on fait une pulpe de tout ce matériel ; on délaye dans deux parties d'eau et l'on fait ingérer 500 grammes de cette émulsion virulente à chacun des bœufs.

Lorsqu'un bœuf ainsi traité présente des signes sérieux d'infection naissante on lui administre du sérum spécifique et tout rentre dans l'ordre.

Les bœufs possèdent à ce moment une forte résistance; pourachever de les hyperimmuniser on leur injecte successivement sous la peau, à des intervalles d'une semaine, 1 cent. cube, puis 50 cent. cubes, puis 400 cent. cubes d'émulsion microbienne normale ; on fait usage à cet effet de cultures sur gélose Martin de souches choisies de pasteurellose bovobubaline.

Deux semaines après la dernière injection on fait une première saignée ; on saigne encore une, deux ou trois fois à une semaine d'intervalle.

Le lendemain de la dernière saignée on recharge ; chaque bœuf reçoit sous la peau, en deux points, 400 cent. cubes d'émulsion microbienne et le cycle recommence.

Le sérum des bœufs ainsi préparés agglutine la pasteurelle à un taux voisin de 1/20.000 (méthode de Nicolle et Debains, examen macroscopique).

Les injections massives, à chaque chargement ne sont, habituellement, suivies d'aucun trouble ; la résorption de l'émulsion se fait dans les trois jours ; l'habitus n'est pas altéré. Il est tout à fait exceptionnel qu'on observe les accidents articulaires si fréquents chez les animaux chargés par injections intraveineuses.

Après plusieurs mois de service ininterrompu, certains sujets s'amaigrissent progressivement et l'on doit suspendre pour

aux chargements et saignées. Enfin, il arrive qu'un animal en service depuis plusieurs années, ayant par conséquent subi de nombreux chargements parfaitement supportés, présente des troubles graves dans les jours qui suivent un chargement en tout point semblable aux autres, et meure de pasteurellose ; voici un exemple de cette sorte d'accident :

Il s'agit d'un bœuf qui a été immunisé en juillet 1932, puis hyperimmunisé selon le protocole décrit précédemment ; on l'a chargé ensuite et saigné régulièrement à vingt reprises, il a donc reçu au total la masse de pasteurelles produites par 40 boîtes de Roux ; toutes ces inoculations massives ont été bien supportées ; après la dernière, pratiquée en juillet 1933, le barbone évolue sous une forme tout à fait classique et l'animal meurt après trois jours de maladie ; les examens du sang et de la sérosité d'œdème, leurs ensemencements et l'inoculation au veau confirment l'étiologie des troubles déclenchés par le chargement (2).

### Technique des inoculations expérimentales.

Les injections de sérum ont été faites, selon les cas, dans la veine (jugulaire chez le veau, marginale de l'oreille chez le lapin) ou sous la peau ; des précisions seront données à cet égard pour chaque expérience.

D'autre part, les émulsions virulentes étaient obtenues toujours par raclage sous eau physiologique d'une culture de trente-six heures sur gélose Martin.

Des essais méthodiques ont conduit à choisir pour le veau la dose de 10 cent. cubes d'une émulsion microbienne normale diluée au 1/100 ; chaque sujet recevait donc 1/10 de centimètre cube de l'émulsion normale ; on injectait en deux points, à raison de 5 cent. cubes par point, sur le côté du cou et derrière l'épaule, du côté opposé à celui où l'on injectait le sérum.

Pour le lapin, on s'est arrêté à la dose de 1/5.000.000 de centimètre cube de la même émulsion normale, dose toujours mortelle ; chaque sujet recevait 1 cent. cube de dilution dans le tissu conjonctif sous-cutané de la face interne de la cuisse.

Nous rappellerons ici que le lapin, celui que nous employons

(2) Pour plus de détails sur ces accidents, voir *Bull. Acad. Vétér. de France*, avril 1938, p. 250.

du moins, est l'animal réactif de choix de la pasteurelle bovo-bubaline ; on peut dire de lui, mais de lui seul, que le germe le tue à l'unité ; il en va tout autrement du veau et du bufflon ; ces animaux se comportent très diversement selon leurs dispositions individuelles, selon la souche microbienne mise en œuvre et selon l'âge des cultures ; ce serait une grosse erreur de croire que la pasteurelle bovo-bubaline inoculée au bœuf ou au buffle les tue à l'unité.

Chez le lapin comme chez le veau et le buffle l'expérimentation sur la pasteurellose bovo-bubaline se heurte à des difficultés, en Indochine et probablement ailleurs.

Chez le lapin, d'une sensibilité parfaite, il faut doser soigneusement le virus dont on fait usage, en administrer une quantité suffisante, pour tuer tous les témoins sans exception mais assez réduite cependant pour ne pas tuer aussi tous les sujets d'expérience. Chez le veau, pour n'être pas gêné par la résistance assez grande de certains sujets, il faut dépasser largement la dose habituellement mortelle et, au surplus, ne tenir pour concluants que les essais dans lesquels tous les témoins ont été tués.

Mais lorsqu'on s'est entouré de ces garanties on a le droit d'apporter des conclusions fermes et l'on est fondé à en étendre l'application à la prophylaxie de la pasteurellose dans les troupeaux.

Les expériences ont été réparties en trois chapitres selon qu'elles concernaient l'emploi du sérum à titre préventif, en séro-inoculation ou à titre curatif.

#### A. — LE SÉRUM EST EMPLOYÉ A TITRE PRÉVENTIF.

**PREMIÈRE EXPÉRIENCE.** — On fait usage d'un mélange de sérums provenant de la première saignée de 8 bœufs ; chaque sujet reçoit d'abord 20 cent. cubes de sérum en plusieurs injections sous-cutanées ; les animaux sont répartis en trois groupes de 4 ; ils seront éprouvés simultanément et en même temps que 4 témoins ; le sérum leur est administré à des intervalles de cinq jours, de manière que l'épreuve vienne pour ces divers groupes, cinq, dix et quinze jours respectivement après l'injection de sérum.

DÉLAIS ÉCOULÉS entre l'injection de sérum et l'inoculation virulente en jours	NUMÉROS des sujets	SUITES DE L'INOCULATION VIRULENTE
5 . . . . .	3.262	Pas de réaction thermique; œdème de 5 centimètres au point d'inoculation.
5 . . . . .	4.487	Pas de réaction thermique; œdème de 10 centimètres au point d'inoculation.
5 . . . . .	3.486	Hyperthermie légère pendant 2 jours; rien au point d'inoculation.
5 . . . . .	3.488	Hyperthermie modérée pendant 3 jours; œdème de 10 centimètres au point d'inoculation.
10 . . . . .	3.480	Pas de réaction thermique; pas de réaction locale.
10 . . . . .	3.394	Simple indication thermique; pas de réaction locale.
10 . . . . .	3.481	Simple indication thermique; œdème de 5 centimètres au point d'inoculation.
10 . . . . .	3.389	Simple indication thermique; œdème de 10 centimètres au point d'inoculation.
15 . . . . .	3.475	Pas de réaction thermique; pas de réaction locale.
15 . . . . .	3.477	Pas de réaction thermique; œdème de 10 centimètres.
15 . . . . .	3.476	Simple indication thermique; œdème de 10 centimètres.
15 . . . . .	3.464	Réaction thermique pendant 48 heures; œdème de 5 centimètres.

Des 4 témoins, 2 meurent en vingt-quatre heures, les 2 autres trente-six heures après l'inoculation virulente.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — On procède comme dans l'expérience précédente mais en injectant 10 cent. cubes seulement de sérum à chaque veau.

DÉLAIS ÉCOULÉS entre l'injection de sérum et l'inoculation virulente en jours	NUMÉROS des sujets	SUITES DE L'INOCULATION VIRULENTE
5 . . . . .	3.628	Réaction thermique en clocher le 2 <sup>e</sup> jour; œdème de 10 centimètres.
5 . . . . .	3.630	Réaction thermique légère pendant 4 jours; légère infiltration au point d'inoculation.
5 . . . . .	3.627	Réaction thermique légère pendant 3 jours; œdème de 10 centimètres.
5 . . . . .	3.629	Mêmes observations.

DÉLAIS ÉCOULÉS entre l'injection de sérum et l'inoculation virulente en jours	NUMÉROS des sujets	SUITES DE L'INOCULATION VIRULENTE
10 . . . . .	3.555	Pas de réaction thermique; pas de réaction locale.
10 . . . . .	3.334	Réaction thermique en clocher le 2 <sup>e</sup> jour; œdème de 10 centimètres.
10 . . . . .	3.546	Réaction thermique légère et brève; œdème de 10 centimètres.
10 . . . . .	3.547	Mêmes observations.
15 . . . . .	3.548	Pas de réaction thermique; œdème de 20 centimètres.
15 . . . . .	3.331	Réaction thermique brève et légère; œdème de 10 centimètres.
15 . . . . .	3.549	Simple indication thermique; œdème de 30 centimètres.
15 . . . . .	3.530	Réaction thermique légère; œdème de 20 centimètres.

Les 4 témoins meurent, l'un vingt-quatre heures, les autres trente-six heures après l'inoculation virulente.

TROISIÈME EXPÉRIENCE. — Comme dans l'expérience précédente, on injecte 10 cent. cubes de sérum aux sujets des trois groupes, mais à des intervalles tels que l'épreuve virulente, pratiquée le même jour pour tous les veaux, vienne quinze, trente et quarante-cinq jours respectivement après l'injection de sérum.

DÉLAIS ÉCOULÉS entre l'injection de sérum et l'inoculation virulente en jours	NUMÉROS des sujets	SUITES DE L'INOCULATION VIRULENTE
15 . . . . .	3.597	Hyperthermie de 1°5 le premier soir; localement rien.
15 . . . . .	3.603	Même indication thermique; œdème de 5 centimètres.
15 . . . . .	3.632	Même indication thermique; localement rien.
30 . . . . .	3.660	Réaction thermique qui dure 6 jours; œdème de 15 centimètres.
30 . . . . .	3.662	Même réaction thermique; œdème de 20 centimètres qui s'abcède.
30 . . . . .	3.594	Même réaction thermique; œdème de 10 centimètres.
45 . . . . .	3.653	Hyperthermie de 1° le premier soir; œdème de 20 centimètres.
45 . . . . .	3.596	Hyperthermie de 1°5 le premier soir; œdème de 10 centimètres.
45 . . . . .	3.601	Maladie mortelle en 36 heures.

Les 3 témoins meurent trente heures après l'inoculation virulente.

**QUATRIÈME EXPÉRIENCE.** — On expérimente sur des lapins de 1 kilogramme ; il est fait usage d'un mélange de 10 sérums de première saignée. Trois lapins reçoivent chacun sous la peau 5 cent. cubes de sérum ; deux jours après, on les éprouve par inoculation d'émulsion virulente ; ils ne présentent aucun trouble. Les 4 témoins meurent, 2 trente-six-heures, les 2 autres quarante-huit heures après l'inoculation.

**CINQUIÈME EXPÉRIENCE.** — On procède de la même façon avec 3 autres lapins en injectant seulement à chacun 2 cent. cubes de sérum.

A l'épreuve, 2 de ces lapins meurent ; après quatre jours de maladie, le troisième reste indemne. Les 3 témoins meurent trois jours après l'inoculation virulente.

Il ressort de cet ensemble d'expériences que le sérum de bœufs préparés comme nous l'avons indiqué possède un pouvoir préventif très marqué vis-à-vis de la pasteurellose bovine expérimentale ; son action peut être mise en évidence chez le veau comme chez le lapin ; injecté sous la peau à la dose de 10 cent. cubes ce sérum a protégé le veau de 125 kilogrammes pendant plus d'un mois contre une inoculation de pasteurelle sûrement et rapidement mortelle pour tous les témoins.

Chez les veaux préalablement placés sous la protection du sérum, l'inoculation virulente est, dans un certain nombre de cas, comme l'indiquent les tableaux, suivie de la formation d'un œdème inflammatoire ; cet œdème se résorbe plus ou moins vite, en moins de trois jours lorsque l'animal doit guérir ; il se développe progressivement dans le cas contraire ; une fois seulement il s'est abcédé.

#### B. — LE SÉRUM EST ADMINISTRÉ EN MÊME TEMPS QUE L'ÉMULSION VIRULENTE.

Sérum et émulsion virulente sont injectés en deux points différents, le premier par voie veineuse ou hypodermique, la deuxième par voie hypodermique ; il s'agit donc de séro-inoculation.

**PREMIÈRE EXPÉRIENCE.** — Six veaux reçoivent sous la peau, en même temps que l'émulsion virulente, 20, 30 ou 50 cent. cubes d'un mélange de sérums de première saignée de 10 bœufs ; ils résistent tous, excepté

l'un de ceux qui ont reçu 50 cent. cubes, les 2 autres témoins, qui n'ont reçu que l'émulsion virulente, meurent respectivement deux jours et trois jours et demi après.

DOSE DE SÉRUM en cent. cubes	NUMÉROS des veaux	SUITES DE LA SÉRO-INOCULATION
20 . . . . .	1.116	Réaction thermique pendant 3 jours; au point d'inoculation de l'émulsion virulente, œdème inflammatoire de 10 centimètres qui s'abcède.
20 . . . . .	1.104	Réaction thermique pendant 24 heures; même réaction locale que chez le sujet précédent.
35 . . . . .	1.131	Réaction thermique pendant 24 heures; même réaction locale que chez le sujet précédent.
35 . . . . .	1.083	Réaction thermique pendant 24 heures; même réaction locale que chez le sujet précédent.
50 . . . . .	1.123	Même réaction thermique; petit œdème qui se résorbe.
50 . . . . .	1.126	Maladie mortelle en 60 heures.

DEUXIÈME EXPÉRIENCE. — Quinze veaux reçoivent d'une part l'émulsion virulente sous la peau et, dans la veine, 25, 50 ou 75 cent. cubes d'un mélange de sérum de première saignée de 16 bœufs. Ils résistent tous à l'exception d'un de ceux qui ont reçu 50 cent. cubes de sérum.

Les 5 témoins meurent vingt-quatre, trente-six ou quarante-huit heures après.

DOSE DE SÉRUM en cent. cubes	NUMÉROS des veaux	SUITES DE LA SÉRO-INOCULATION
25 . . . . .	3.243	Ne présente aucun trouble.
25 . . . . .	3.302	Indication thermique sans plus.
25 . . . . .	3.183	Indication thermique sans plus.
25 . . . . .	3.287	Indication thermique sans plus.
25 . . . . .	3.284	Réaction thermique modérée pendant 2 jours.
50 . . . . .	3.244	Ne présente aucun trouble.
50 . . . . .	3.237	Ne présente aucun trouble.
50 . . . . .	3.226	Ne présente aucun trouble.
50 . . . . .	3.245	Indication thermique sans plus.
50 . . . . .	3.246	Maladie mortelle en 4 jours.
75 . . . . .	3.236	Ne présente aucun trouble.
75 . . . . .	3.241	Ne présente aucun trouble.
75 . . . . .	3.225	Indication thermique sans plus.
75 . . . . .	3.240	Indication thermique sans plus.
75 . . . . .	3.224	Réaction thermique légère pendant 24 heures.

**TROISIÈME EXPÉRIENCE.** — On expérimente encore sur 15 veaux ; le même sérum que dans l'expérience précédente est administré par voie veineuse aux doses de 10, 15 et 20 cent. cubes ; 2 veaux seulement meurent, l'un de ceux qui ont reçu 10 cent. cubes et l'un de ceux qui ont reçu 15 cent. cubes.

Les 5 témoins meurent dans des délais inférieurs à quarante-huit heures.

DOSE DE SÉRUM en cent. cubes	NUMÉROS des veaux	SUITES DE LA SÉRO-INOCULATION
—	—	—
10 . . . . .	3.219	Ne présente aucun trouble.
10 . . . . .	3.081	Hyperthermie de 1°5 pendant moins de 24 heures.
10 . . . . .	3.083	Hyperthermie de 1°5 ; localement rien.
10 . . . . .	3.289	Hyperthermie de 2° pendant moins de 24 heures.
10 . . . . .	3.223	Maladie mortelle en 4 jours.
15 . . . . .	3.143	Hyperthermie de 1° pendant 36 heures.
15 . . . . .	3.218	Hyperthermie de 2° pendant 24 heures.
15 . . . . .	3.076	Hyperthermie de 2° pendant 24 heures.
15 . . . . .	3.078	Hyperthermie de 2° pendant 24 heures.
15 . . . . .	3.142	Maladie mortelle en 3 jours.
20 . . . . .	3.182	Hyperthermie de 1° dans la soirée.
20 . . . . .	3.191	Hyperthermie de 1°5 dans la soirée.
20 . . . . .	3.188	Hyperthermie de 1°5 dans la soirée.
20 . . . . .	3.221	Hyperthermie de 1°5 dans la soirée.
20 . . . . .	3.186	Hyperthermie de 2°5 dans la soirée.

**QUATRIÈME EXPÉRIENCE.** — On renouvelle l'expérience précédente, en injectant, du même sérum, 2, 4 ou 7 cent. cubes. Les 5 veaux qui ont reçu 2 cent. cubes de sérum, 2 de ceux qui ont reçu 4 cent. cubes et l'un de ceux qui ont reçu 7 cent. cubes meurent.

DOSE DE SÉRUM en cent. cubes	NUMÉROS des veaux	SUITES DE LA SÉRO-INOCULATION
—	—	—
2 . . . . .	3.309	Maladie mortelle en 50 heures.
2 . . . . .	3.312	Maladie mortelle en 50 heures.
2 . . . . .	3.203	Maladie mortelle en 50 heures.
2 . . . . .	3.311	Maladie mortelle en 50 heures.
2 . . . . .	3.317	Maladie mortelle en 36 heures.
4 . . . . .	3.232	Ne présente aucun trouble.
4 . . . . .	3.233	Ne présente aucun trouble.
4 . . . . .	3.316	Clocher thermique le deuxième jour ; localement rien.
4 . . . . .	3.310	Maladie mortelle en 60 heures.
4 . . . . .	3.314	Maladie mortelle en 60 heures.
7 . . . . .	3.313	Ne présente aucun trouble.
7 . . . . .	3.080	Ne présente aucun trouble.
7 . . . . .	3.080	Ne présente aucun trouble.
7 . . . . .	3.205	Ne présente aucun trouble.
7 . . . . .	3.217	Ne présente aucun trouble.
7 . . . . .	3.308	Maladie mortelle en 52 heures.

La conclusion de cette série d'essais peut se formuler ainsi : à la dose de 2 cent. cubes le sérum utilisé est resté sans effet appréciable sur l'évolution de l'infection expérimentale ; aux doses voisines de 10 cent. cubes, il a préservé de la mort, et en supprimant toute espèce de troubles graves, 12 veaux sur 15 ; à partir de la dose de 20 cent. cubes, son efficacité n'a été en défaut que deux fois sur 26.

**CINQUIÈME EXPÉRIENCE.** — Nous avons groupé ici tous les essais de séro-inoculation qui ont été effectués sur le lapin et avec un mélange de sérum fournis par les premières saignées de 10 bœufs.

Le sérum a été administré à des doses décroissantes, pur ou en dilution ; les doses de sérum supérieures à 1/2 cent. cube ont été injectées par moitié dans la veine de l'oreille, par moitié sous la peau ; les doses égales ou inférieures à 1/2 cent. cube entièrement dans la veine ; chaque lapin a reçu par inoculation sous-cutanée 1/500.000 de centimètre cube d'émulsion virulente.

Parmi les 34 lapins qui ont été soumis à la séro-inoculation, 23 ont survécu et 11 sont morts ; ces derniers avaient reçu des quantités de sérum comprises entre 1/150 de centimètre cube et 1/2 cent. cube.

Aux doses de 1/100 et de 1/50 de centimètre cube le sérum protégeait encore 1 lapin sur 3.

Les 19 lapins témoins sont morts dans les délais habituels qui sont de un, deux ou trois jours ; chez les sujets séro-inoculés qui ont succombé, la mort est survenue plus tardivement dans la plupart des cas, la survie atteignant six jours chez certains animaux. Chez les sujets inoculés qui ont survécu, les troubles ont été très faibles, parfois inappréhensibles.

NOMBRE de lapins séro-inoculés	DOSES DE SÉRUM ET NOMBRE DE LAPINS MORTS							
	2 c. c.	1 c. c.	1/2 c. c.	1/4 de c. c.	1/10 de c. c.	1/50 de c. c.	1/100 de c. c.	1/150 de c. c.
3 . . . . .	—	—	—	—	—	—	—	—
4 . . . . .	0							
6 . . . . .				1				
4 . . . . .					2			
6 . . . . .						1		
3 . . . . .						2		
3 . . . . .							2	
3 . . . . .								3
<b>Totau : 34</b> séro-inoculés								<b>11 morts.</b>

**SIXIÈME EXPÉRIENCE.** — Nous avons groupé ici les essais effectués sur le lapin dans les conditions énoncées précédemment mais avec le mélange des sérum de trois saignées successives de 9 bœufs hyperimmunisés.

Dix-huit lapins ont été soumis à la séro-inoculation ; 10 ont succombé ; chez ces derniers la mort est survenue dans des délais compris entre deux jours et neuf jours. Les 8 témoins sont morts dans des délais ne dépassant pas deux jours.

NOMBRE de lapins séro-inoculés	DOSES DE SÉRUM ET NOMBRE DE LAPINS MORTS			
	1/2 c. c.	1/5 de c. c.	1/10 de c. c.	1/25 de c. c.
6 . . . . .	1	—	—	—
8 . . . . .	—	5	—	—
2 . . . . .	—	—	2	—
2 . . . . .	—	—	—	2

Ainsi les deux échantillons de sérum se sont comportés de façon analogue sur le lapin : à la dose de 1/2 cent. cube ils ont protégé cet animal dans 5 cas sur 6 ; il apparaît qu'aux doses supérieures le sérum protégeait tous les lapins tandis qu'à partir d'une dose voisine de 1/25 de centimètre cube il ne pouvait, dans la plupart des cas, que retarder la mort.

### C. — LE SÉRUM EST EMPLOYÉ A TITRE CURATIF.

**PREMIÈRE EXPÉRIENCE.** — On expérimente sur de jeunes vaches de 170 kilogrammes ; elles sont d'abord inoculées de pasteurellose par injection sous-cutanée d'émulsion virulente. Dans les heures qui suivent on injecte un mélange de sérums provenant de la première saignée de 8 bœufs hyperimmunisés ; ce sérum est injecté dans la jugulaire à la dose uniforme de 30 cent. cubes.

L'INJECTION DE SÉRUM EST FAITE	—	NUMÉROS	RÉSULTATS
6 heures après l'inoculation . . . . .	—	3.552	Guérison.
	—	3.554	Guérison.
	—	3.555	Guérison.
12 heures après l'inoculation . . . . .	—	3.556	Guérison.
	—	3.557	Guérison.
	—	3.558	Guérison.

Les 3 vaches témoins, qui ne reçoivent pas de sérum, meurent moins de quarante-huit heures après l'inoculation.

**DEUXIÈME EXPÉRIENCE.** — On emploie le même sérum, par voie veineuse encore.

L'INJECTION DE SÉRUM est faite	—	NUMÉROS	RÉSULTATS
10 heures après l'inocu- tion . . . . .	—	3.567	Guérison.
	—	3.574	Guérison.
	—	3.578	Maladie mortelle en 3 jours.
20 heures après l'inocu- tion . . . . .	—	3.577	Guérison.
	—	3.581	Maladie mortelle en 2 j. 1/2.
	—	3.563	Maladie mortelle en 4 jours.
30 heures après l'inocu- tion . . . . .	—	3.569	Maladie mortelle en 1 j. 1/2.
	—	3.571	Maladie mortelle en 2 j. 1/2.
	—	3.553	Maladie mortelle en 3 jours.

Deux vaches non traitées meurent après trente-six heures.

**TROISIÈME EXPÉRIENCE.** — On fait usage d'un mélange de sérum provenant de la première saignée de 9 bœufs hyperimmunisés ; six heures après l'inoculation virulente, 5 veaux de 130 kilogrammes reçoivent chacun par voie veineuse 50 cent. cubes de sérum ; 3 meurent et 2 survivent. Les 5 témoins meurent.

**QUATRIÈME EXPÉRIENCE.** — On traite 3 lapins qui ont subi six heures plus tôt l'inoculation virulente ; chacun d'eux reçoit sous la peau 5 cent. cubes de sérum provenant de la première saignée de 10 bœufs hyperimmunisés ; l'un meurt de pasteurellose dans les quarante-huit heures, les 2 autres survivent sans trouble apparent. Les 4 témoins meurent, 2 vingt-quatre heures et 2 trente-six heures après l'inoculation.

Il apparaît ainsi qu'administré assez tôt et par voie veineuse le sérum permet d'obtenir dans un grand nombre de cas la guérison de la pasteurellose expérimentale mortelle pour les témoins : la fièvre cède progressivement pour disparaître en moins de quarante-huit heures ; l'œdème local se résorbe dans des délais variables, de trois à douze jours ; il peut s'abcéder, donnant un pus à pasteurelle pure.

### Essais comparatifs de sérum provenant de saignées successives.

**PREMIÈRE EXPÉRIENCE.** — On utilise à titre préventif, sur des groupes de veaux distincts, les séums de mélange provenant respectivement de la première saignée et de la troisième saignée de 8 bœufs hyperimmunisés. Les sujets seront éprouvés quinze, trente ou quarante-cinq jours après, mais ils ont reçu le sérum de telle manière que l'épreuve par inoculation virulente puisse être faite à tous le même jour.

DÉLAIS entre l'injection de sérum virulente en jours	RÉSULTATS	
	Sérum de première saignée	Sérum de troisième saignée
15 . .	3.597, guérison.	3.537, guérison.
15 . .	3.605, guérison.	3.595, guérison.
15 . .	3.652, guérison.	3.602, guérison.
30 . .	3.660, guérison.	3.598, guérison.
30 . .	3.662, guérison.	3.599, guérison.
30 . .	3.594, guérison.	3.600, maladie mortelle en 3 j.
45 . .	3.653, guérison.	3.658, guérison.
45 . .	3.596, guérison.	3.664, maladie mortelle en 2 j. 1/2.
45 . .	3.601, maladie mortelle en 36 h.	3.665, maladie mortelle en 30 h.

Les 3 témoins meurent trente heures après l'inoculation.

**DEUXIÈME EXPÉRIENCE.** — On fait l'essai comparatif des sérum de saignées successives par séro-inoculation. Chaque sujet reçoit en même temps que la dose d'émulsion virulente sous la peau, 5 cent. cubes de sérum, seulement, dans la jugulaire,

*Premier essai :*

SÉRUM DE PREMIÈRE SAIGNÉE

—  
3.472, guérison.  
3.464, guérison.  
3.468, guérison.  
3.458, guérison.

SÉRUM DE TROISIÈME SAIGNÉE

—  
3.466, guérison.  
3.467, guérison.  
3.469, maladie mortelle en 4 jours.  
3.463, maladie mortelle en 36 heures.

Les 4 témoins meurent, 3 moins de un jour et 1 moins de deux jours après l'inoculation.

*Deuxième essai :*

SÉRUM  
de première saignée

—  
3.427, guérison.  
3.429, guérison.  
3.440, guérison.  
3.441, maladie mortelle  
en 2 jours.

SÉRUM  
de troisième saignée

—  
3.451, guérison.  
3.450, guérison.  
3.506, maladie mortelle  
en 60 heures.  
3.497, maladie mortelle  
en 3 jours.

SÉRUM  
de quatrième saignée

—  
3.533, guérison.  
3.525, guérison.  
3.507, maladie mortelle  
en 48 heures.  
3.426, maladie mortelle  
en 36 heures.

Les 3 témoins meurent, 2 vingt-quatre heures, le troisième trente-six heures après l'inoculation virulente.

**TROISIÈME EXPÉRIENCE.** — On essaye simultanément, à titre abortif, les sérum de première saignée et de troisième saignée de 10 bœufs hyperimmunisés ; chaque sujet subit d'abord l'inoculation de l'émulsion microbienne ; douze heures après on lui injecte 25 cent. cubes de sérum dans la jugulaire.

SÉRUM DE PREMIÈRE SAIGNÉE

—  
3.713, guérison.  
3.096, guérison.  
3.711, guérison.

SÉRUM DE TROISIÈME SAIGNÉE

—  
3.697, guérison.  
3.710, guérison.  
3.717, maladie mortelle en 38 heures.

Les 3 témoins meurent, l'un vingt-quatre heures, les 2 autres deux jours après l'inoculation virulente.

La conclusion de ces trois expériences est que la première saignée des bœufs hyperimmunisés donne un sérum d'une activité préventive, abortive et curative nettement supérieure à celle des sérum fournis par les saignées suivantes.

**QUATRIÈME EXPÉRIENCE.** — On a groupé ici tous les essais de séro-inoculation qui ont été effectués sur le lapin avec sérum de première saignée et sérum de quatrième saignée comparativement ; l'émulsion virulente a été injectée par voie hypodermique à la dose habituelle, 1/500.000 de centimètre cube, le sérum a été employé par voie veineuse, à des doses décroissantes.

DOSES de sérum en cent. cubes	SÉRUM DE PREMIÈRE SAIGNÉE	SÉRUM DE TROISIÈME SAIGNÉE
2. . .	2 essais : 2 guérisons.	2 essais : 2 guérisons.
1. . .	4 essais : 4 guérisons.	4 essais : 2 guérisons, 2 morts.
1/2. .	6 essais : 5 guérisons, 1 mort.	6 essais : 4 guérisons, 2 morts.
1/4. .	4 essais : 2 guérisons, 2 morts.	4 essais : 3 guérisons, 1 mort.
1/5. .	2 essais, 2 guérisons.	2 essais : 1 guérison, 1 mort.
1/10..	3 essais : 3 guérisons.	3 essais : 3 guérisons.
1/50..	3 essais : 1 guérison, 2 morts.	3 essais : 1 guérison, 2 morts.
1/100.	3 essais : 1 guérison, 2 morts.	3 essais : 1 guérison, 2 morts.

Les 13 lapins employés comme témoins sont morts dans les délais ordinaires.

Ces résultats confirment ceux qui ont été obtenus chez le veau : à la dose de 1/2 cent. cube, dose au-dessous de laquelle, en l'espèce, il ne se montre pas régulièrement efficace, le sérum de première saignée préserve un plus grand nombre de lapins que le sérum de troisième saignée.

On remarquera d'ailleurs que, à des doses inférieures, comprises entre 1/4 et 1/100 de centimètre cube, ces sérum ont agi de façon tout à fait comparable.

### Emploi à titre curatif, du sérum spécifique, de l'antivirus et de l'atoxyl, comparativement.

**PREMIER ESSAI.** — On fait usage, d'une part, d'un mélange de sérum provenant de la première saignée de 10 bœufs hyperimmunisés, d'autre part d'antivirus, et enfin d'atoxyl en solution au 1/10. L'antivirus est préparé de la façon suivante par le procédé rapide de Rouslacroix : on ensemence un ballon de 300 cent. cubes de bouillon ; quatre jours après, on ajoute 8 grammes de poudre d'infusoires stérilisée ; on chauffe au bain-marie en agitant de temps en temps pendant vingt minutes à 85°, puis pendant quelques instants à 100° ; on laisse refroidir aux environs de 50°, on verse sur filtre Laurent double, stérilisé à sec ; on répartit en ampoules qu'on porte à 85° pendant dix minutes.

Les veaux sont inoculés de pasteurellose dans les formes habituelles ; dix-sept heures après on les soumet au traitement.

TRAITEMENT	NUMÉROS	RÉSULTATS
60 cent. cubes de sérum dans la veine. . . . .	3.906	Maladie mortelle en 2 jours.
60 cent. cubes de sérum dans la veine. . . . .	3.920	Guérison.
60 cent. cubes de sérum dans la veine. . . . .	3.905	Guérison.
60 cent. cubes d'antivirus dans la veine. . . . .	3.902	Maladie mortelle en 2 jours.
60 cent. cubes d'antivirus dans la veine. . . . .	3.907	Maladie mortelle en 3 jours.
60 cent. cubes d'antivirus dans la veine. . . . .	3.908	Guérison.
20 cent. cubes d'atoxyl au 1/10 dans la veine . . . . .	3.922	Maladie mortelle en 2 jours.
20 cent. cubes d'atoxyl au 1/10 dans la veine . . . . .	3.918	Maladie mortelle en 3 jours.
20 cent. cubes d'atoxyl au 1/10 dans la veine . . . . .	3.919	Maladie mortelle en 3 jours.

DEUXIÈME ESSAI. — Les veaux inoculés de pasteurellose sont traités cinq heures après.

TRAITEMENT	NUMÉROS	RÉSULTATS
50 cent. cubes de sérum dans la jugulaire. . . . .	4.392	Guérison.
50 cent. cubes de sérum dans la jugulaire. . . . .	4.393	Guérison.
50 cent. cubes d'antivirus dans la jugulaire. . . . .	4.389	Maladie mortelle en 36 heures.
50 cent. cubes d'antivirus dans la jugulaire. . . . .	4.394	Maladie mortelle en 24 heures.
25 cent. cubes d'atoxyl au 1/10 dans la jugulaire. . . . .	4.390	Maladie mortelle en 36 heures.
25 cent. cubes d'atoxyl au 1/10 dans la jugulaire. . . . .	4.397	Maladie mortelle en 36 heures.

En résumé, dans les conditions, il est vrai, sévères de ces expériences, l'antivirus et l'atoxyl sont restés à peu près dépourvus d'action sur la pasteurellose expérimentale du veau, tandis que le sérum a permis de guérir 4 malades sur 5.

### Conclusions.

Les bœufs, préparés par injections hypodermiques massives d'émulsion de *Pasteurella bovisepctica* cultivée sur gélose, possèdent un sérum doué de propriétés très marquées contre la pasteurellose bovo-bubaline.

Indépendamment des résultats obtenus chez le lapin, animal éminemment sensible à l'action de *Pasteurella bovisepctica*, les investigations expérimentales effectuées chez le veau ont permis de préciser les qualités de ce sérum.

A titre préventif, employé à la dose de 10 cent. cubes, il est apte à protéger le veau pendant plus d'un mois contre l'inoculation virulente.

Dans le traitement curatif de la pasteurellose expérimentale, il permet d'obtenir la guérison dans un grand nombre de cas lorsqu'on l'administre assez rapidement et par voie veineuse. A ce titre, il se révèle très supérieur à certains agents chimio-thérapeutiques, tels que l'atoxyl ou biothérapeutiques tels que l'antivirus spécifique.

Lorsqu'on l'injecte en même temps qu'on pratique l'inoculation microbienne, ce qui revient à l'employer à titre abortif, en quelque sorte, il exerce une action empêchante très précise à partir de doses voisines de 10 cent. cubes.

Si après le chargement virulent des bœufs producteurs on effectue plusieurs saignées successives à quelques jours d'intervalle, le sérum provenant de la première saignée est plus actif que celui que fournissent les saignées suivantes et sa supériorité est assez grande pour qu'il apparaisse recommandable de ne saigner les bœufs qu'une ou deux fois dans l'intervalle des chargements.

Le sérum dont les propriétés ont été exposées ici est employé en Indochine depuis plusieurs années ; la séro-prévention contre la pasteurellose a été appliquée à plus de 30.000 bœufs ou buffles (30.000), appartenant à des troupeaux du Sud-Annam, de la Cochinchine et du Cambodge ; et c'est par centaines que se comptent les interventions chez des animaux en incubation ou déjà malades.

Nous recommandons la posologie suivante : à titre préventif, pour une protection de trois à quatre semaines, de 15 à 30 cent. cubes pour les bovidés du pays dont les plus gros pèsent en moyenne 350 kilogrammes et de 25 à 50 cent. cubes pour les buffles dont les plus gros pèsent en moyenne 500 kilogrammes ; à titre curatif, de 50 à 150 cent. cubes selon la taille de l'animal et la gravité de l'infection.

En définitive, dans leur ensemble numériquement important, les bons résultats obtenus dans la pratique indochinoise ont largement confirmé les conclusions des études expérimentales.

On peut penser que, dans les régions tempérées, où la maladie, pour être moins meurtrière, cause cependant de graves préjudices aux éleveurs, il ne serait pas sans utilité de mettre à profit le pouvoir préventif particulièrement élevé du sérum spécifique pour protéger les animaux exposés à la contamination, et d'associer ses effets abortifs à l'action des médications non spécifiques dans le traitement hâtif des pasteurelloses déclarées.

# RECHERCHES SUR LES EFFETS TOXIQUES DES BACILLES TUBERCULEUX BOVINS MORTS SUR L'ORGANISME DU LAPIN

par F. VAN DEINSE et J. SOLOMIDÈS.

*(Institut Pasteur. Laboratoires de recherches  
sur la tuberculose.)*

L'un de nous a insisté à plusieurs reprises sur cette propriété du bacille tuberculeux aviaire, de provoquer chez le lapin une toxi-infection rapidement mortelle, dite du type Yersin, quand ce germe est incorporé à cet animal à dose convenable par la voie endo-veineuse. Cette toxi-infection est remarquable à cause de la prépondérance que prennent les lésions banales, inflammatoires ou dégénératives (toxiques), surtout dans le rein, à côté desquelles les formations spécifiquement tuberculeuses, nodulaires, restent à l'arrière-plan. Ces éléments nodulaires font même presque toujours totalement défaut à l'examen macroscopique, et on ne les trouve qu'à l'examen microscopique des coupes d'organes de lapins, morts de cette infection à allure toxi-infectieuse, due au bacille aviaire. Par contre, l'inoculation par voie veineuse d'une dose convenable de bacilles tuberculeux de type bovin est suivie, chez le même animal, d'une maladie toxi-infectieuse, également rapidement mortelle, à laquelle on a donné le même nom qu'à la première, et qui évolue avec des symptômes cliniques sensiblement pareils, mais qui se distingue toutefois de la tuberculose Yersin due au bacille aviaire par la présence constante, à l'autopsie, d'une granulie intense, macroscopiquement visible, des poumons. Si les deux espèces bacillaires se distinguent déjà ainsi à l'œil nu l'une de l'autre par les effets qu'elles créent chez le lapin, l'examen histo-pathologique ne fera que confirmer cette différence. En effet, les lésions histologiques du poumon, dues au bacille aviaire, sont surtout

caractérisées par une infiltration à polynucléaires et à histiocytes de la trame, alors que, dans l'infection bovine, l'infiltration nodulaire prend nettement le dessus dans cet organe. De même dans les reins, les lésions causées par le bacille aviaire ont un caractère toxique banal (dégénérescence granuleuse de tubes contournés, réactions interstitielles à polynucléaires, etc.), alors que le bacille bovin y provoque de nombreux nodules tuberculeux (1).

Or, en inoculant à plusieurs reprises à des lapins, par voie veineuse, des doses convenables de bacilles aviaires morts, on peut assister à des morts par choc, à la suite de la huitième injection environ, et on constate alors que ces animaux morts par choc après une série d'injections de bacilles aviaires morts, présentent des lésions sensiblement analogues à celles qu'on trouve chez des lapins, morts d'une tuberculose Yersin à la suite d'une inoculation de bacilles aviaires vivants, mais avec cette différence que les lésions nodulaires font ici totalement défaut, et que de fortes congestions, des infiltrations histiolympcytaires importantes, avec quelques cellules géantes, et une prolifération diffuse épithélioïde forment les caractéristiques des images. D'autre part, en n'injectant pas toutes les doses de bacilles aviaires morts par voie veineuse, mais en les inoculant par voie sous-cutanée à partir de la quatrième par exemple, on assiste, dans certains cas, à une mort par cachexie. On trouve sur les coupes du rein de ces animaux de la cytolysé et pycnose des tubes contournés, et par ailleurs les mêmes lésions que chez les animaux morts par choc (2).

De ces constatations histo-pathologiques nous avons cru pouvoir déduire que le bacille tuberculeux aviaire se distingue surtout par sa « toxicité », le bacille bovin par sa « virulence ». Les lésions inflammatoires, dégénératives, seraient dues à la « toxicité », les lésions nodulaires à la « virulence ». Nous nous rendons parfaitement compte du caractère schématique et arbitraire de cette distinction, qui n'a d'ailleurs que la valeur d'une hypothèse de travail.

Le facteur « toxique » existe certainement chez le bacille

(1) F. VAN DEINSE. Ces *Annales*, 59, 1937, p. 182.

(2) F. VAN DEINSE, *loc. cit.*

bovin comme chez le bacille aviaire. Seulement, le facteur «virulence», la faculté de créer des formations nodulaires est tellement prépondérante chez le bacille bovin qu'elle couvre et rend moins évidentes les lésions banales inflammatoires et dégénératives qu'il provoque en même temps, comme l'avaient constaté Léon Bernard et Gougerot (3).

Il nous a semblé intéressant de vérifier si, par l'artifice des injections de bacilles bovins morts, on pouvait mettre en évidence avec plus de facilité les propriétés «toxiques» de ce germe, tout comme cela avait été possible pour le bacille aviaire.

Avant de procéder à la description des expériences que nous avons entreprises à cet effet, nous donnerons un exposé sommaire des travaux que d'autres ont effectués sur ce sujet avant nous, et des considérations auxquelles ces travaux ont donné lieu.

M. Prudden et E. Hodenpyl montrèrent, en 1891, que l'inoculation intraveineuse chez le lapin de bacilles tuberculeux morts est suivie de la formation, dans les poumons de cet animal, de nodules spécifiques qui n'aboutissent pas à la caséification (4).

La même année, en France, I. Straus et N. Gamaleia (5) constatèrent que des lapins, auxquels ils avaient injecté par voie veineuse une forte dose de bacilles tuberculeux morts de type humain en suspension épaisse, mouraient en trois semaines et présentaient à l'autopsie une granulie plus ou moins intense des poumons. Si toutefois la même quantité de bacilles morts était très finement émulsionnée dans de l'eau, de façon à ce que les corps bacillaires fussent le plus possible séparés les uns des autres, l'inoculation veineuse de cette suspension bacillaire extrêmement fine, tout en tuant les lapins dans les mêmes délais que la première, ne provoquait pas de formations nodulaires aux poumons. La mort, disent les auteurs, est due en ce cas à une sorte d'intoxication avec cachexie progressive. Aux bacilles tuberculeux morts est

(3) Soc. d'Etudes Scient. sur la Tuberculose, juin 1908. Léon BERNARD. *Titres et travaux scientifiques*. Paris, Masson édit., 1919, p. 39.

(4) *New York Med. J.*, 6 et 20 juin 1891.

(5) *Arch. Méd. Exp.*, 3, 1891, p. 705.

inhérente, toujours d'après les mêmes auteurs, une propriété toxique à longue échéance, se révélant par la susceptibilité extrême que présentent les lapins, après introduction d'une petite dose non mortelle de bacilles morts, à l'égard d'une nouvelle introduction de bacilles. Quant au siège de cette toxicité, Straus et Gamaleia précisent que ce n'est pas dans le milieu de culture, où le bacille a végété, que l'on trouve les principaux produits toxiques qu'il élabore. Ces substances sont fixées et retenues dans le corps même du bacille.

Plus récemment on retrouve ces mêmes notions formulées dans le livre de J. Albert-Weil (6) : les lésions de tuberculose localisée consécutives à l'inoculation de bacilles morts sont dues évidemment aux poisons endo-cellulaires du bacille tuberculeux. Il est vrai qu'il n'existe aucune cloison étanche entre les poisons adhérents et les poisons solubles des bacilles de Koch. Toutefois, seules les fractions protéiques extraites des corps bacillaires, lorsqu'elles n'ont pas été dénaturées par les manipulations chimiques, sont toxiques pour l'animal sain. Elles sont beaucoup plus toxiques encore pour l'animal tuberculeux.

En traitant de cette toxicité des bacilles tuberculeux morts. Auclair et Paris (7) arrivent à cette « conclusion quelque peu inattendue, mais logique, d'un germe devenant surtout toxique après sa mort ».

Or, cette toxicité, inhérente aux bacilles morts, s'exerce grâce à la sensibilisation de l'organisme auquel on les injecte. En effet, les travaux de Krompecher (8) et ceux de A. Boquet et L. Nègre (9) nous ont appris que les bacilles tuberculeux morts et leurs protéides exercent avec une intensité variable la même action préparante que les bacilles vivants et virulents. Et, comme s'est exprimé A. R. Rich : « On peut dire que l'existence d'une hypersensibilité change un microbe qui ne produit pas de toxine en un microbe producteur de toxine » (10).

(6) J. ALBERT-WEIL. *Les poisons du bacille tuberculeux et les réactions cellulaires et humorales dans la tuberculose*. Paris, Baillière et fils, 1931.

(7) *Arch. Méd. Exp.*, 20, 1908, p. 749.

(8) Ces *Annales*, 14, 1900, p. 723.

(9) Ces *Annales*, 40, 1926, p. 11.

(10) *Rev. d'Immunol.*, 3, n° 1, janvier 1937, p. 25.

En d'autres termes, le bacille tuberculeux, qui n'élabore pas de toxine comme le fait par exemple le bacille tétanique, devient très toxique, surtout à l'état mort, pour un organisme allergique. C'est ainsi que A. Boquet a pu écrire, avec raison, "qu'on peut supposer que les formes inflammatoires de la tuberculose relèvent moins des effets pathogènes directs du bacille de Koch que des réactions allergiques durables, entretenues par la tuberculine endogène libérée des corps microbiens" (11). Empruntons encore les termes suivants à R. Rössle, pour définir cette allergie : "L'essence de l'hypersensibilité, dit-il, c'est la toxicité de plus en plus forte d'un antigène préalablement inoffensif" (12). Rien d'étonnant, par conséquent, qu'on soit arrivé de nos jours, pour différentes maladies, à de nouvelles conceptions quant à leur pathogénèse, et qu'il semble devenir évident que différentes lésions et différents symptômes morbides, qu'on croyait jusqu'ici être dus à l'action directe de poisons microbiens, sont en réalité l'effet, non d'un poison microbien, mais d'un état d'hypersensibilité. Nous rappelons à ce propos les nouvelles conceptions concernant la glomérulo-néphrite post-scarlatineuse, sur lesquelles nous reviendrons. En ce qui concerne la tuberculose, il devient de plus en plus probable que beaucoup de lésions tuberculeuses sont l'effet de l'allergie acquise vis-à-vis des protéides bacillaires (13). Rich et Lewis n'ont-ils pas montré que, même *in vitro*, les cellules appartenant à des cultures de tissu provenant d'un organisme allergique sont tuées par une dose de tuberculine, inoffensive pour des cultures de tissu provenant d'un organisme normal ? (14). On comprend, dans ces conditions, que l'inoculation intraveineuse de bacilles tuberculeux morts, chez des animaux fortement sensibilisés, comporte de graves dangers pour la vie de ces animaux, comme l'ont constaté, entre autres, J. Freund et E. Opie (15).

De l'exposé de ces faits se dégagent les notions suivantes :

(11) *Rev. d'Immunol.*, 2, mars 1936, p. 150.

(12) *Wien. klin. Wochenschr.*, n° 20, 1932, p. 609.

(13) A. R. RICH, *loc. cit.*

(14) *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 50, 1932, p. 115.

(15) *J. Exp. Med.*, 68, n° 2, 1938, p. 273.

quand on incorpore des bacilles tuberculeux morts à l'organisme d'un animal, celui-ci devient hypersensible, allergique, et les corps bacillaires agissent dès lors à son égard comme un poison. L'inoculation de fortes doses de corps bacillaires morts, du type des mammifères, provoque l'apparition de formations nodulaires. Si on veut étudier les lésions purement inflammatoires, dégénératives, non nodulaires, que devraient créer ces mêmes bacilles morts dans un organisme sensibilisé par eux, il importe, par conséquent, de ne pas dépasser certaines doses.

Voici maintenant la description des expériences que nous avons tentées, en vue de mettre en évidence ces réactions non nodulaires, non spécifiques, que créent dans l'organisme du lapin sensibilisé les bacilles bovins morts, et dans lesquelles nous nous sommes inspirés des notions en question.

Deux souches de bacilles tuberculeux de type bovin nous ont servi pour ces expériences : la souche B-1 et la souche H. Nous avons, d'une part, inoculé à des lapins des émulsions de ces bacilles, stérilisées par chauffage (une heure à 70°) ; d'autre part, des cultures de la souche H dans le milieu liquide de Besredka furent, après séjour d'un mois à 38°, mises en suspension dans 2 cent. cubes du liquide même ayant servi à la culture, et gardées en ampoules scellées à la température du laboratoire ; le contenu de ces ampoules fut inoculé à des lapins respectivement deux ans et demi et quatre ans après la mise en ampoules. Les ensemencements sur Löwenstein d'une partie de leur contenu restèrent tous stériles, ce qui montre que les bacilles qui s'y trouvaient étaient morts. D'ailleurs, les ensemencements des organes des lapins inoculés avec ces bacilles, effectués après la mort de ces animaux, sont également restés stériles.

Seize lapins ont servi à ces expériences, dont 2 reçurent des bacilles B-1 chauffés, 10 des bacilles H chauffés et 4 des bacilles H provenant des ampoules scellées. Voici le détail de ces recherches :

1. *Lapin D-98.* Reçoit 4 injections intraveineuses, à cinq jours d'intervalle, de 1 milligramme de bacilles B-1 chauffés chacune ; il meurt le lendemain de la quatrième injection. L'autopsie ne révèle rien d'anormal ; la rate est petite, aucune formation nodulaire.

*Examen histologique.* Poumon : congestion et infiltration diffuse à polynucléaires de la trame, sans réaction nodulaire. Foie : ectasie veineuse et infiltration légère diffuse à polynucléaires ; hyperplasie et hypertrophie notables des cellules de Kupffer. Rate : hyperplasie réticulaire et endothéliale ; sinus perméables, riches en hématies et macrophages.

2. *Lapin D-97.* Reçoit, à cinq jours d'intervalle, 3 injections intraveineuses et 3 sous-cutanées de 1 milligramme de bacilles B-1 chauffés chacune ; meurt deux jours après la dernière injection.

*Autopsie :* Poumons vitreux, rate très tuméfiée, 10 fois son volume normal, foie décoloré.

*Examen histologique.* Poumon : alvéolite desquamative, quelques nodules folliculaires épithélioïdes. Foie : traînées et flots réticulaires réactionnels disséminés en grand nombre avec cellules géantes et infiltration leucocytaire diffuse. Rate : raréfaction lymphoïde et hyperplasie réticulaire en nappes, riches en cellules géantes. Rein : congestion, infiltration des glomérules, réaction endothéliale et interstitielle, flots de dégénérescence épithéliale des tubes contournés.

3. *Lapin B-C-B-274.* Reçoit 5 injections intraveineuses, à cinq jours d'intervalle, de 1 milligramme de bacilles H chauffés ; il meurt onze jours après la dernière. *Autopsie :* de fortes congestions de tous les organes ; reins doublés de volume.

*Examen histologique.* Poumon : alvéolite desquamative et plages nécrotiques. Foie : ectasie vasculaire, œdème hémorragique, plages de nécrose et flots réticulaires. Rate : aplasie lymphoïde. Rein : œdème et exsudat des glomérules, infiltration interstitielle, lésions dégénératives limitées des tubes contournés.

4. *Lapin G-278.* Reçoit 9 injections intraveineuses, à cinq jours d'intervalle, chacune de 1 milligramme de bacilles H chauffés. Meurt trois jours après la dernière. *Autopsie :* atrophie de la rate et du foie, nulle part aucun nodule.

*Examen histologique.* Poumon : semis confluent de nodules histiolympcytaires. Foie : infiltration réticulo-lymphocytaire avec plasmodes. Rate : hyperplasie réticulaire, raréfaction lymphoïde. Rein : œdème des glomérules ; quelques cylindres, quelques tubes en voie de dégénérescence.

5. *Lapin R-278.* Reçoit 10 injections intraveineuses à cinq jours d'intervalle, chacune de 1 milligramme de bacilles H chauffés. Meurt trois mois après la dernière ; aucune formation nodulaire ; rate petite. Par erreur, pas d'examen histologique.

6. *Lapin B-247.* Reçoit 10 injections intraveineuses à cinq jours d'intervalle, chacune de 1 milligramme de bacilles H chauffés. Meurt le lendemain de la dixième injection. *Autopsie :* poumons hépatisés, avec réseau de taches grises anastomosantes ; rate tuméfiée six fois son volume normal ; pas de formations nodulaires.

*Examen histologique.* Poumon : prolifération histiolympcytaire généralisée avec plasmodes et plages caséuses. Foie : réaction réticulo-

lymphocytaire en placards disséminés, plasmodes et infiltration diffuse. Rate : plages épithélioïdes et plasmodes nombreux. Rein : infiltration interstitielle et dégénérescence des tubes contournés.

7. *Lapin G-247*. Traité comme le précédent. Meurt dix-neuf jours après la dernière (dixième) injection de bacilles H morts. *Autopsie* : foie et rate atrophiés ; semis de petites taches grises sur la face dorsale des poumons ; reins : petites taches rouges et marbrures.

*Examen histologique*. Poumon : infiltration diffuse histioleucocytaire de la trame ; quelques nodules d'alvéolite épithélioïde. Foie : infiltration leucocytaire diffuse formant parfois de petits foyers. Rate : hyperplasie réticulaire massive des cordons. Rein : œdème, dilatation des glomérules, dégénérescence des tubes contournés, ectasie vasculaire.

8. *Lapin G-283*. Reçoit, comme les précédents, 10 injections intraveineuses de bacilles H morts. Meurt trois jours après la dernière. *Autopsie* : cachexie extrême ; pas de nodules visibles.

*Examen histologique*. Poumon : infiltration histiolympphocytaire diffuse de la trame et des alvéoles ; exsudats bronchiques. Foie : infiltration réactionnelle diffuse et nodulaire avec plasmodes nombreux. Rate : dilatation des sinus ; hyperplasie réticulaire des cordons. Rein : dégénérescence granuleuse de quelques tubes avec ou sans pycnose.

9. *Lapin G-E-B-283*. Reçoit 9 injections intraveineuses à cinq jours d'intervalle, chacune de 1 milligramme de bacilles H chauffés. Meurt deux jours après la neuvième. *Autopsie* : cachexie ; poumons hépatisés.

*Examen histologique*. Poumon : réaction exsudative diffuse des alvéoles et des bronches ; nodules histiocytaires disséminés. Foie : infiltration réticulo-fibrocytaire morcelant les lobules. Rate : raréfaction cellulaire ; œdème hémorragique cortical ; quelques nodules réactionnels à tendance nécrotique. Rein : infiltration et sclérose des glomérules ; sclérose interstitielle ; quelques tubes en dégénérescence granuleuse.

10. *Lapin G-280*. Reçoit 5 injections intraveineuses à cinq jours d'intervalle, chacune de 1 milligramme de bacilles H chauffés. Meurt cinq jours après la cinquième injection. *Autopsie* : poumons vitreux sans nodules visibles ; rate légèrement tuméfiée.

*Examen histologique*. Poumon : congestion, infiltration massive histioleucocytaire non folliculaire, riche en polynucléaires. Foie : infiltration leucocytaire et prolifération réticulaire diffuse ; quelques cellules géantes. Rate : réaction histioleucocytaire massive ; polynucléaires nombreux en voie de phagocytose. Rein : œdème des glomérules ; quelques aspects dégénératifs des tubes contournés.

11. *Lapin B-274*. Reçoit une dose unique de 10 milligrammes de bacilles H chauffés par voie veineuse. Meurt trente et un jours plus tard. *Autopsie* : pas de formations nodulaires visibles ; forte décoloration du foie et des reins ; rate légèrement tuméfiée.

*Examen histologique*. Poumon : infiltration de la trame, surtout périvasculaire, et œdème alvéolaire. Foie : de nombreux petits nodules réactionnels. Rate : hypoplasie, raréfaction lymphoïde. Reins : de nombreux aspects granuleux corticaux.

12. *Lapin G-274.* Reçoit comme le précédent une seule injection intraveineuse de 10 milligrammes de bacilles H chauffés. Meurt seize jours après. *Autopsie* : pas de nodules visibles ; légère congestion des poumons et de la rate ; reins marbrés.

*Examen histologique.* Poumon : infiltration histioleucocytaire diffuse de la trame et des alvéoles ; plages hémorragiques. Foie : réaction réticulo-leucocytaire diffuse ; plasmodes. Rate : œdème hémorragique, pulpe rouge ; de nombreux polynucléaires dans les corpuscules de Malpighi. Rein : congestion, réaction endothéliale ; quelques tubes en voie de dégénérescence.

13. *Lapin A-243.* Reçoit dans la veine 1/5 du contenu d'une ampoule H-Besredka (environ 2 milligrammes de corps bacillaires), gardée deux ans et demi à la température du laboratoire. Meurt six mois plus tard. *Autopsie* : cachexie ; rate et foie atrophiés ; pas de nodules visibles. Pas d'examen histologique ; organes jetés par erreur.

14. *Lapin B-243.* Reçoit la même dose du même produit que le précédent ; meurt trois jours après lui, six mois après l'inoculation. *Autopsie* : cachexie ; rate et foie atrophiés ; aucune formation nodulaire visible.

*Examen histologique.* Poumon : congestion, infiltration diffuse et œdème de la trame. Foie : infiltration abondante à polynucléaires des lobules. Rate : structure bouleversée par congestion, hémorragies, sclérose, œdème, pigment ocre abondant. Rein : néphrite interstitielle chronique ; sclérose glomérulaire.

15. *Lapin G-280.* Reçoit 1/10 du contenu d'une ampoule H-Besredka, gardée quatre ans à la température du laboratoire (environ 1 milligramme de corps bacillaires) par voie veineuse. Survit, apparemment en bonne santé après un amaigrissement important mais passager.

16. *Lapin N-280.* Reçoit la même dose du même produit que le précédent ; meurt quarante-deux jours plus tard. *Autopsie* : animal maigre ; léger épanchement péritonéal ; rate petite ; pas de nodules.

*Examen histologique.* Poumon : infiltration leucocytaire irrégulière de la trame et plages hémorragiques. Foie : infiltration diffuse assez abondante, lobules et espaces portes ; de nombreuses cellules hépatiques en pycnose. Rate : sclérose et macrophagie de pigment ocre. Rein : congestion ; sclérose interstitielle ; nécrose granulaire de nombreux tubes contournés (néphrite toxique).

Bien entendu, aucun de ces animaux n'est mort d'une maladie intercurrente, aucun microbe secondaire n'a pu être mis en évidence chez eux. Ce sont donc bien les poisons bacillaires qui ont causé leur mort.

La plupart de ces lapins ont été suivis cliniquement au cours de l'observation : leur poids a été contrôlé régulièrement, et nous avons suivi leur formule leucocytaire, égale-

ment à intervalles réguliers. Il y a toujours eu une baisse de poids importante, variant de 300 à 600 grammes et aboutissant même, comme le montrent les observations 13 et 14, à de la cachexie, dans les cas de survie suffisamment longue. Les examens du sang n'ont rien donné de bien remarquable pour la formule leucocytaire, si ce n'est chez certains animaux une basophilie polynucléaire, pouvant atteindre 22 p. 100. Nous avons déjà attiré l'attention sur la valeur de ce symptôme comme signe d'intoxication (16). Les éosinophiles disparaissent régulièrement au début, mais, chose curieuse, chez quelques lapins les éosinophiles ont réapparu vers la fin de la série d'injections de bacilles morts, pour redisparaître d'ailleurs définitivement aux approches de la mort. Dans la série rouge on remarque assez régulièrement de la polychromatophilie, autre signe d'empoisonnement.

#### DISCUSSION.

En parcourant ces seize observations, on constate d'abord l'absence quasi régulière de formations nodulaires visibles à l'œil nu. On n'en voit que dans l'observation 7, chez le lapin G-247, qui eut un semis de petites taches grises sur la face dorsale des poumons. Mais à l'examen microscopique on trouve plus fréquemment des formations nodulaires : au total six fois, dans les n°s 2, 4, 7, 8, 9 et 11. Ces formations concernent trois fois les poumons seuls (obs. 2, 4 et 7), une fois les poumons et la rate (obs. 9) et deux fois le foie seul (obs. 8 et 11). Mais il y a des cas où les lésions trouvées à l'examen histologique, tout en n'ayant pas le caractère nodulaire, n'en trahissent pas moins leur nature tuberculeuse typique : l'observation 6, par exemple, où l'on voit sur les coupes du poumon une prolifération histiolympocytaire généralisée avec plasmodes et plages caséuses, ainsi que des plages épithélioïdes à plasmodes dans la rate. Il est certain que les lapins des observations 4, 5, 6, 7, 8 et 9 ont été traités de façon trop intense : 9 à 10 injections intraveineuses, chacune de 1 milligramme de bacilles tués par chauffage

(16) *C. R. Soc. Biol.*, **129**, 1938, p. 828.

provenant de la souche H extrêmement virulente, à cinq jours d'intervalle. Les plus belles observations sont les n°s 13, 14, 15 et 16, concernant les lapins qui ont reçu par voie veineuse une seule dose moyenne de bacilles bovins, morts naturellement, sans avoir subi le chauffage de une heure à 70°. Parmi ces 4 lapins, 1 seul a survécu ; 2 sont morts six mois après l'inoculation, et le quatrième quarante-deux jours après. Malheureusement, on a omis par erreur de garder les organes d'un de ces lapins, mort après six mois. Mais les coupes, provenant des organes des 2 autres lapins de cette catégorie, montrent l'absence totale de toute lésion tuberculeuse spécifique. Ce ne sont que des infiltrations diffuses et de l'œdème de la trame dans les poumons, des infiltrations à polynucléaires des lobules hépatiques, de la sclérose et de la macrophagie de pigment ocre dans la rate, et des signes de néphrite toxique sur les coupes du rein.

Il y a un organe, cependant, où les lésions spécifiques font constamment défaut, même chez les lapins le plus sévèrement éprouvés : c'est le rein (\*). En même temps les reins portent dans tous les cas où ces organes ont été examinés histologiquement (12 fois sur 16) des signes évidents d'intoxication. Il y a de la dégénérescence des tubes contournés dans tous les cas ; de l'œdème ou de l'infiltration glomérulaire, aboutissant à de la sclérose quand la survie est assez longue (n°s 9 et surtout 14) dans sept cas ; des infiltrations interstitielles, aboutissant également à de la sclérose interstitielle dans six cas.

Donc, en résumant, nos expériences semblent montrer que l'inoculation par voie veineuse au lapin de bacilles tuberculeux de type bovin, morts soit par chauffage, soit spontanément par vieillissement, en tubes scellés, soit à doses répétées, soit en une seule fois et à dose modérée, est suivie de la mort des animaux à plus ou moins bref délai, à de très rares exceptions près. A l'autopsie on ne trouve presque jamais de lésions nodulaires visibles à l'œil nu ; on voit quelquefois des formations nodulaires ou des lésions diffuses mais de caractère incontestablement tuberculeux à l'examen

(\*) Nous spécifions que les autopsies furent pratiquées le plus tôt possible après la mort des animaux pour éviter les modifications cadavériques de l'épithélium rénal.

microscopique des poumons, du foie et de la rate. Par contre, les reins n'ont jamais présenté sur les coupes d'autres lésions que celles d'un empoisonnement banal, et celles-ci constamment.

Nous sommes obligés de conclure, de ces observations, que les bacilles tuberculeux morts, introduits chez le lapin par voie veineuse, sensibilisent d'abord l'organisme de cet animal; qu'ensuite les « endotuberculines » des corps bacillaires morts agissent sur les différents tissus de cet organisme sensibilisé comme un véritable poison, et cette activité toxique banale se manifeste de la façon la plus pure au niveau du rein, qui réagit à l'empoisonnement par de véritables néphrites toxiques, qui n'ont rien de spécifiquement tuberculeux. Nous citons pour mémoire les effets que produit, dans le rein du lapin, l'inoculation intraveineuse d'une dose de 1 milligramme de bacilles bovins vivants et bien virulents, provoquant chez cet animal une tuberculose toxi-infectieuse type Yersin rapidement mortelle (et caractérisée, comme nous le disions plus haut, par une granulie constante des poumons, visible à l'œil nu). Après la mort, survenant en deux ou trois semaines, on trouve dans ce cas le rein d'aspect normal, mais sur les coupes on voit constamment de très nombreux nodules caséux à bacilles, une congestion glomérulaire et de la cytolysé de tubes plus ou moins nombreux (17). Par contre, avec des bacilles bovins morts, on constate l'absence totale des nodules dans les reins ; il ne reste que la néphrite toxique.

On voit combien ces faits se rapprochent de ceux qui ont été observés après des injections au lapin de bacilles aviaires morts, et sur lesquels nous avons récemment attiré l'attention (18).

Sans doute le bacille aviaire est doué d'une « toxicité » particulière, mais nos expériences montrent que le bacille bovin possède, lui aussi, un facteur « toxique » non négligeable.

Il est intéressant de citer quelques auteurs, à propos de ces lésions rénales toxiques, dues aux poisons bacillaires

(17) F. VAN DEINSE, *loc. cit.*

(18) Ces *Annales*, 63, 1939, p. 443.

chez le lapin. Car nous lisons en effet, dans l'étude sur la vaccination tuberculeuse de J. Grancher et H. Martin (19) : « Les animaux traités par la tuberculose atténuée sont vaccinés contre le tubercule virulent, mais exposés à une cachexie progressive, dont la lésion anatomique est tantôt la scrofule-tuberculose, tantôt une néphrite parenchymateuse. » Wells, de Witt et Long (20) insistent sur l'existence très fréquente de lésions rénales plus ou moins étendues dans la tuberculose en général, et attribuent la présence à peu près constante de ces lésions, à caractère dégénératif, de l'épithélium rénal, aux effets de la destruction toxique des tissus dans la tuberculose. Les effets toxiques de la tuberculose ne sont d'ailleurs pas réservés aux reins. Récemment, F. E. Schmengler (21) attira l'attention sur la fréquence des réactions de Takata positives dans certaines tuberculoses pulmonaires, ce qui semble prouver que le foie est lui aussi le siège de lésions toxiques. On sait, en effet, que la réaction de Takata est un signe important en faveur de l'existence d'une lésion hépatique, surtout (d'après Schmengler) d'origine allergique.

Mais nos expériences ne semblent pas être seulement une indication pour l'existence de ce pouvoir toxique des bacilles tuberculeux, elles semblent en même temps fournir un appui à cette conception, qui attribue la cause de certaines néphropathies à un état d'allergie. Nous y avons déjà fait allusion plus haut : la glomérulo-néphrite diffuse post-scarlatineuse, attribuée généralement autrefois à l'action directe de la toxine streptococcique sur le tissu rénal, est considérée aujourd'hui par certains auteurs comme étant due à l'allergisation de ce tissu vis-à-vis du poison de ce germe (22). Huebschmann (1929), et plus tard Fahr (1934), attribuèrent la néphrite interstitielle proliférative à l'action d'une endotoxine microbienne sur un rein sensibilisé vis-à-vis de cette toxine (23). D'autre part, Masugi et Isibasi ont réussi à provoquer, chez

(19) *Rev. de la Tuberc.*, 1, 1893, p. 289.

(20) *The Chemistry of Tuberculosis*. Baltimore, 1923.

(21) *Klin. Wochenschr.*, n° 21, 1939, p. 742.

(22) Voir C. G. AHLSTRÖM. *Acta Pathol. et Microbiol. Scand. Suppl.* 29, 1936.

(23) Cités par AHLSTRÖM, *loc. cit.*

des animaux, des néphropathies, qu'ils identifient à la glomérulo-néphrite diffuse, par des inoculations répétées de corps microbiens (24).

Nous n'osierions pas prendre position dans cette question, qui dépasse notre compétence. Nous voulons seulement faire un rapprochement entre ces conceptions nouvelles et les résultats de nos expériences, que nous voudrions *résumer* ainsi :

Les poisons des corps bacillaires bovins morts introduits par voie veineuse, après avoir allergisé l'organisme et par conséquent aussi le tissu rénal du lapin, sont capables de provoquer chez cet animal des néphropathies banales, qui tantôt prennent l'allure de glomérulo-néphrites, tantôt d'infiltrations ou de scléroses interstitielles, ou bien d'une combinaison des deux, mais toujours accompagnées d'une dégénérescence des tubes contournés, sans qu'il soit possible de reconnaître histologiquement l'origine tuberculeuse de ces lésions (25).

(24) Cités par AHLSTRÖM, *loc. cit.*

(25) Nous remercions M. BABLET, qui a bien voulu nous aider de ses conseils dans l'interprétation des coupes histologiques.

## **SUR LES VARIATIONS DE LA TENEUR EN BORE DES FEUILLES AVEC L'AGE**

par GABRIEL BERTRAND et LAZARE SILBERSTEIN.

L'étude du mode de répartition du bore dans les organes d'une plante, en vue d'acquérir des indications sur le rôle physiologique de ce métalloïde, nous a montré, entre autres choses, que les feuilles sont beaucoup plus riches que l'ensemble du végétal : nous avons trouvé dans le lis blanc, récolté au moment de la floraison et en rapportant les résultats à la matière sèche, plus de 10 milligrammes de bore par kilogramme dans les feuilles au lieu de 4,2 dans la plante entière (1). Cette répartition est d'accord à la fois avec la fonction synthétique dévolue à l'organe foliaire et avec l'action positive jouée par le bore dans les processus nutritifs. Il semble donc qu'il doive exister une relation entre l'activité de la feuille et sa teneur en bore. Nous avons cherché cette relation en déterminant la teneur en métalloïde à différentes périodes du développement, depuis le bourgeon jusqu'à l'âge adulte et même au delà.

Les bourgeons ont été examinés au printemps, lorsqu'ils étaient gonflés et prêts à s'ouvrir ; les petites feuilles ont été séparées des écailles qui les protégeaient et analysées isolément. Dans la suite, les feuilles ont été récoltées au fur et à mesure de leur accroissement ; on a séparé les pétioles et opéré seulement sur les limbes. Ceux-ci ont été pesés, débarrassés des poussières qui pouvaient souiller leur surface par un rapide lavage à l'eau distillée, essuyés avec du papier à filtre et mis à sécher. Les dosages de bore ont été effectués par la méthode au curcuma, dont nous nous sommes servis dans nos recherches antérieures. Les poids de substances sèches analysées étaient généralement compris entre un 1/2 gramme et 1 gramme ; dans le cas de certains bourgeons, il s'est abaissé à environ 0 gr. 3 à cause de la plus grande difficulté de récolte de la matière première.

(1) *Ces Annales*, 61, 1938, p. 104.

Les lots de feuilles, devant représenter des échantillons moyens, étaient en général très supérieurs à ceux nécessaires pour les dosages. Afin de faire des prises d'essai correctes, on réalisait la dessiccation en deux temps : on séchait d'abord à peu près les feuilles à l'étuve, jusqu'à ce qu'elles deviennent friables, on les réduisait en poudre au moulin, et c'est sur une portion aliquote de cette poudre, conservée dans un flacon, que l'on procérait, après une dessiccation à poids constant, au dosage du métalloïde.

Nous avons examiné les feuilles, récoltées l'année dernière, du Marronnier d'Inde (*Aesculus hippocastanum* L.), variété à fleurs rouges, du Fusain du Japon (*Evonymus japonicus* L.), du Sorbier des oiseaux (*Sorbus aucuparia* L.), du Lilas (*Syringa vulgaris* L.) et du Sapin épicéa (*Abies excelsa* D. C.), arbres et arbisseaux cultivés dans le jardin de l'Institut Pasteur.

Dans l'exposé des résultats que nous donnons (page 89), les longueurs exprimées sont celles des limbes pour les feuilles entières (Fusain, Lilas, Sapin) et celles des folioles pour les feuilles composées (Marronnier et Sorbier).

Ces résultats rappellent singulièrement, par leur allure générale, ceux qui ont été obtenus par l'un de nous en collaboration avec M<sup>me</sup> Rosenblatt à propos du manganèse (2), autre biocatalyseur. Cette fois encore, la teneur en oligoélément présente un maximum dans la première partie du développement de la feuille, c'est-à-dire dans sa période de plus intense activité physiologique, soit dès le bourgeon, soit un peu après l'épanouissement de celui-ci. La teneur en bore, comme celle du manganèse, subit ensuite une diminution plus ou moins durable et plus ou moins accentuée ; enfin, dans certains cas aussi, il y a un relèvement final, tantôt faible, tantôt assez fort pour que la proportion de l'oligoélément arrive à dépasser dans la vieille feuille celle même du bourgeon. Mais, dans ces derniers cas, il y a peut-être dépôt progressif d'une partie du bore, comme aussi du manganèse, sous une forme presque insoluble et physiologiquement presque inactive. On sait déjà qu'il en est ainsi dans de nombreuses espèces pour le calcium.

(2) Gab. BERTRAND et M<sup>me</sup> M. ROSENBLATT. Ces *Annales*, 36, 1922, p. 494.

NOMS des espèces	DATES des récoltes	LONGUEURS moyennes en centimètres	PÔIDS SECS moyens en gramme	MATIÈRES SÈCHES p. 100	CENDRES p. 100 de matières sèches	BORE par kilogramme de matières fraîches en milligrammes	BORE par kilogramme de matières sèches en milligrammes
<i>Marronnier :</i>							
Bourgeons : . . . .	15 mars.						
Feuilles . . . .				30,2	4,54	3,0	9,8
Ecailles . . . .				33,1	5,96	2,7	8,3
Folioles . . . .	8 avril.	3	0,018	24,5	6,00	1,3	6,2
Folioles . . . .	30 avril.	10	0,105	20,8	9,11	4,4	6,7
Folioles . . . .	25 mai.	20	0,533	26,5	7,76	2,4	7,8
Folioles . . . .	20 juin.	22	0,774	30,3	10,05	2,9	9,5
Folioles . . . .	20 juillet.	23	0,955	31,9	11,50	3,5	11,1
<i>Fusain :</i>							
Bourgeons : . . . .	16 mars.						
Feuilles . . . .				18,4	8,23	1,5	8,1
Ecailles . . . .				28,0	10,86	2,0	7,1
Feuilles . . . .	8 avril.	1,5	0,012	48,5	7,67	2,2	12,0
Feuilles . . . .	30 avril.	3	0,071	25,9	9,62	3,3	12,8
Feuilles . . . .	25 mai.	6	0,163	32,3	14,54	2,8	8,6
Feuilles . . . .	20 juin.	7	0,224	34,5	15,65	3,0	8,7
Feuilles . . . .	20 juillet.	7	0,263	39,8	19,35	3,2	8,1
<i>Sorbier :</i>							
Bourgeons : . . . .	16 mars.						
Feuilles . . . .				24,7	6,67	2,4	9,8
Ecailles . . . .				38,3	6,52	3,4	8,2
Folioles . . . .	8 avril.	3	0,026	29,4	6,98	1,8	6,0
Folioles . . . .	30 avril.	6	0,412	30,6	6,54	2,8	9,3
Folioles . . . .	25 mai.	12	0,295	37,8	6,45	3,3	8,8
Folioles . . . .	20 juin.	12	0,336	44,5	7,42	3,0	7,2
Folioles . . . .	20 juillet.	12	0,374	43,8	7,47	1,9	4,4
<i>Lilas :</i>							
Bourgeons : . . . .	16 mars.						
Feuilles . . . .				27,2	5,94	2,6	9,4
Ecailles . . . .				33,8	3,68	2,5	7,4
Feuilles . . . .	3 avril.	3	0,016	26,4	5,94	1,9	7,2
Feuilles . . . .	30 avril.	5	0,071	26,1	6,29	2,0	7,7
Feuilles . . . .	25 mai.	10	0,354	24,4	8,33	1,5	6,1
Feuilles . . . .	20 juin.	13	0,778	31,8	8,43	1,8	5,8
Feuilles . . . .	20 juillet.	13	0,895	32,8	8,40	1,2	3,8
<i>Sapin :</i>							
Bourgeons : . . . .	1 <sup>er</sup> avril.						
Feuilles . . . .				20,8	5,65	1,8	8,8
Ecailles . . . .				77,3	3,25	6,9	8,9
Feuilles . . . .	20 avril.	4	0,0006	47,5	4,82	0,8	4,5
Feuilles . . . .	12 mai.	1,5	0,0015	27,7	3,86	1,0	3,7
Feuilles . . . .	5 juin.	2	0,0026	38,8	4,18	2,5	6,4
Feuilles . . . .	25 juin.	2,5	0,0043	39,4	5,10	2,0	5,2
Feuilles . . . .	25 juillet.	2,5	0,0050	44,2	9,68	2,4	5,4

# CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE LA DIFFUSION DU MOLYBDENE CHEZ LES VÉGÉTAUX

par M. DIDIER BERTRAND

(*Institut Pasteur, Service de Chimie biologique.*)

Parmi les métaux constitutifs de la matière vivante, il en est un, le molybdène, dont la présence a été signalée dans un certain nombre de cas, mais sur lequel il restait encore beaucoup à faire. Nous l'envisagerons ici dans son rapport avec le règne végétal.

C'est Demarçay [1] qui a le premier, en 1900, trouvé le molybdène dans la matière vivante. Il a reconnu cet élément par la méthode spectrale dans les cendres de divers bois. Il a toutefois exprimé des réserves au sujet de ce résultat, pensant que le molybdène pouvait très bien provenir de l'impureté des réactifs ou de poussières. Malgré sa propre critique, il n'a pas tenté d'expérience de contrôle.

En 1913, Jorissen [2] a découvert du molybdène dans les cendres de certains charbons belges. La question n'a pas été tranchée de savoir si ce métal provenait des végétaux transformés ultérieurement en houille ou des roches environnantes.

Cor nec [3] a recherché, en 1919, tout ce qu'il était possible de trouver par la spectrographie dans des cendres de Laminaires. En particulier, il a signalé le molybdène. Mais on doit faire ici la même réserve que dans le cas de Demarçay.

Toujours par la méthode spectrale, Pereira Forjaz [4], en 1929, a trouvé du molybdène dans les nodosités des racines de *Cytisus proliferus* var. *palmensis*, puis [5], deux ans plus tard, dans les nodosités des racines de *Lupinus albus*.

Comme aucun des auteurs précités n'avait recherché si le molybdène ne provenait pas de matières minérales adhérentes aux plantes ou d'impuretés contenues dans les réactifs, que

leurs travaux n'avaient porté, en tous cas, que sur quelques échantillons végétaux, on ne pouvait encore considérer la présence générale du molybdène chez les végétaux comme démontrée.

C'est alors que H. ter Meulen [6] (1931), ayant rencontré le molybdène dans des cendres de houille, s'est demandé si ce métal provenait des végétaux. Il a mis au point une méthode chimique de recherche et l'a appliquée à divers matériaux parmi lesquels se trouvait une cinquantaine de substances d'origine végétale provenant d'environ 40 espèces différentes. Il a trouvé ainsi de 0 milligr. 01 à 0 milligr. 7 de molybdène par kilogramme de végétal frais et de 2 à 9 milligrammes par kilogramme de graines. Puis, l'année suivante [7], cherchant le molybdène dans quelques plantes aquatiques, il a dosé 0 milligr. 16 par kilogramme d'algue sèche (sans spécifier l'algue qu'il a étudiée).

En 1933, Goldschmidt et Peters [8] ont retrouvé du molybdène dans divers charbons, confirmant ainsi le travail de Jorissen et celui de H. ter Meulen.

En 1934, Dingwald, Kibbin et Beans [9] ont effectué une recherche spectrale du molybdène dans plusieurs plantes de la région de Québec. Leurs résultats ont été positifs dans quelques cas et négatifs dans les autres.

En 1935, H. ter Meulen et Ravenswaay [10], employant la méthode chimique de H. ter Meulen, ont donné quelques analyses concernant la teneur en molybdène de certaines feuilles récoltées en mai et en octobre. Leurs chiffres varient de 0 milligr. 0009 à 0 milligr. 57 pour 1.000 feuilles.

La même année, Stanfield [11], avec une méthode chimique différente de celle de H. ter Meulen, a trouvé 0 milligr. 007 et 0 milligr. 088 au kilogramme dans la luzerne et dans l'orge.

Enfin, en 1936, Konishi et Tsuge [12] ont rencontré par la méthode spectrale le molybdène, déjà signalé par Forjaz, dans des nodosités de légumineuses.

Tous ces travaux, surtout celui de H. ter Meulen, ont positivement amorcé la notion de l'existence du molybdène chez les plantes, mais aucun n'a porté sur les végétaux en général; d'autre part, le plus important, celui de H. ter Meulen, ne se rapporte pas au poids sec des échantillons, mais à leur poids

frais. Or la proportion d'eau varie beaucoup suivant la nature des échantillons et les conditions de la récolte ; il en résulte que les dosages sur les poids frais n'e<sup>nt</sup> permettent de faire que des comparaisons insuffisantes. Il était donc nécessaire de reprendre l'étude du problème dans des conditions plus précises.

A titre d'expérience d'orientation, j'ai d'abord fait un dosage de molybdène suivant la méthode de H. ter Meulen, en opérant sur 500 grammes de graines de haricot blanc, matériel particulièrement riche d'après le chiffre de H. ter Meulen. J'y ai trouvé environ 0 milligr. 73 de molybdène et j'ai contrôlé ensuite spectrographiquement qu'il s'agissait bien de ce métal. A la grandeur près du chiffre trouvé, le résultat est d'accord avec la présence du molybdène établie par H. ter Meulen. Mais la méthode est longue et demande beaucoup de travail, à cause de la très grande prise d'essai qu'elle nécessite : 1 kilogramme en général, de 3 à 5 kilogrammes pour les substances très pauvres. Elle nécessite en outre des quantités élevées de réactifs et cela n'est pas sans augmenter les risques d'erreurs. En conséquence, j'ai cherché et j'ai réussi à trouver une méthode plus sensible et en même temps très précise. Cette méthode permet de trouver et de doser jusqu'à la limite inférieure de 0 milligr. 002 de molybdène dans 100 grammes de matière sèche, soit 0 milligr. 02 pour 1 kilogramme sec correspondant à des quantités de 2,5 à 22 kilogrammes de matière fraîche pour les divers échantillons analysés. Cette méthode sera prochainement décrite dans un autre mémoire [43].

Les échantillons végétaux ont été choisis aussi propres que possible et, sauf dans le cas des feuilles de poirier, lavés soigneusement pour éliminer les poussières. Les racines, qu'il est très difficile d'avoir propres et dont on peut craindre qu'une partie des sels ne s'élimine lors d'un lavage prolongé, n'ont pas été comprises dans les dosages. L'échantillon a été pesé aussitôt après la récolte et, après lavage, desséché vers 50° ; il a été réduit alors en poudre grossière, de manière à constituer un lot homogène. Une portion aliquote de ce lot a servi à doser la matière sèche à 405°. Une autre, correspondant sensiblement à 50 grammes de matière sèche, a servi à la détermination des cendres, puis à celle du molybdène.

	POIDS FRAIS en grammes	POIDS SEC en grammes	MATIÈRE SÈCHE p. 100	CENDRES p. 100	MOLYBDÈNE en milligrammes par kilogramme			
					trouvé	frais	sec	cendres
					CRYPTOGAMES			
Fougère à l'aigle . . . . .	155	48,2	31	7,15	0,026	0,167	0,54	7,7
<i>Pelvetia canaliculata</i> . . . . .	111	33,6	32,1	22,2	0,022	0,198	0,618	2,8
<i>Feva latissima</i> . . . . .	216	47,2	21,8	32	0,033	0,154	0,7	2,02
<i>Fucus vesiculosus</i> . . . . .	368	55,2	15		0,053	0,145	0,965	
Chanterelle . . . . .	435	34,3	7,2	5,65	0,032	0,073	4,0	18
<i>Tricholoma saponaceum</i> . . . . .	173	16,7	9,65	14,4	0,025	0,145	4,5	40,4
PHANEROGAMES								
Plantes à la floraison (partie aérienne seule) :								
Carotte sauvage . . . . .	217	48,5	22,3	11	0,032	0,147	0,674	6
Sarrasin . . . . .	236	47,2	20	8,95	0,037	0,156	0,785	8,7
Mais . . . . .	392	47,5	1,1	9,8	0,047	0,122	0,99	10,3
Iris germanique . . . . .	268	34	42,7	7,15	0,035	0,130	1,0	14,4
Chelidoine . . . . .	261	47	17,9	14,2	0,061	0,234	1,3	8,6
Betterave . . . . .	256	40,4	15,7	19,1	0,061	0,238	1,48	7,7
Plantain long . . . . .	160	47,5	29,6	10,9	0,085	0,540	1,78	16,4
Mauve . . . . .	395	46,7	11,8	20	0,116	0,294	2,4	12,4
Cresson . . . . .	490	17,7	3,6	27	0,048	0,098	2,8	10
Morelle noire . . . . .	144	20,6	14,3	13,2	0,060	0,416	2,9	21,8
Trèfle rouge . . . . .	185	47,4	25,6	7,7	0,180	0,97	3,8	49
Haricot vert . . . . .	391	47,1	12	16,5	0,180	0,46	3,82	22,8
Moutarde blanche . . . . .	98,5	12,4	12,6	18,4	0,050	0,51	4,0	21,6
Luzerne . . . . .	329	78	23,7	12,3	0,339	1,06	4,35	35,2
Fève . . . . .	222	25,8	11,6	11,3	0,120	0,535	4,48	41,3
Feuilles (recueillies au printemps) :								
Cèdre . . . . .	125	51,8	41,4	3,9	0,009	0,064	0,185	4,8
Poireau . . . . .	605	42	6,95	18	0,010	0,016	0,239	4,3
Poirier . . . . .	130	48	37	5,55	0,013	0,104	0,280	5,0
Lierre . . . . .	148,5	46	34	9	0,014	0,095	0,304	3,4
Abies pinsapo . . . . .	97	54,5	56	5,9	0,017	0,175	0,312	5,3
Sapin pectiné . . . . .	132	54,3	41	5,32	0,018	0,136	0,330	6,2
Vigne . . . . .	212	47,5	22,4	5,63	0,016	0,075	0,336	6
Noisetier . . . . .	141	47,3	33,5	7,65	0,018	0,127	0,38	5
Figuier . . . . .	210	49,5	23,5	14	0,025	0,119	0,505	3,58
Chataignier . . . . .	146	47,1	32,1	4,6	0,026	0,178	0,55	12
Pin . . . . .	121	38,4	32,5	2,75	0,022	0,182	5,573	20,2
Wellingtonia . . . . .	156	71,5	45,6	4,9	0,043	0,275	0,6	12,3
Laurier sauce . . . . .	99	47,9	48,4	3,73	0,029	0,293	0,606	16,3
Fusain du Japon . . . . .	186	51,05	27,4	18,5	0,042	0,226	0,825	4,5
Chou (feuilles étiolées) . . . . .	498	34,2	6,9	9,1	0,030	0,060	0,88	9,6
Epinard . . . . .	400	47	11,7	15,6	0,049	0,122	1,04	6,6
Mâche . . . . .	485	33,8	6,95	16,2	0,062	0,127	1,83	11,2
Scarole (feuilles vertes) . . . . .	488	22,1	4,55	22,2	0,051	0,104	2,3	10,3
Chou (feuilles vertes) . . . . .	428	33,4	7,8	16	0,080	0,187	2,4	15
Pêcher . . . . .	155,3	46,5	30	11,5	0,130	0,83	2,8	24,2
Scarole (feuilles étiolées) . . . . .	342	12,85	3,75	15,7	0,045	0,131	3,5	22,4
Organes divers :								
Ecorce d'orange . . . . .		44,6		3,8	0,000	< 0,02	< 1	
Oranges . . . . .	341	58,8	17,2	3,5	0,011	0,032	0,187	5,4

	POIDS FRAIS en grammes	POIDS SEC en grammes	, MATIÈRE SÈCHE p. 100	CENDRES p. 100	MOLYBDÈNE en milligrammes par kilogramme			
					trouvé	frais	sec	cendres
Touraillon d'orge . . . . .	42		5,4	0,019	0,452			8,4
Wellingtonia (bois + écorce) .	97,5	83,5	83,6	2,32	0,057	0,585	0,683	29,4
Groseilles . . . . .	368	46,45	12,5	4,7	0,047	0,128	1,01	22,2
Germe de blé . . . . .	72,3	67,2	93	5,65	0,132	1,82	1,96	34,7
Fèves sans germes . . . . .	99,4			2,68	0,210	2,4		79,8
Ail (gousse) . . . . .	194	37,6	19,4	11,8	0,085	0,435	2,3	49,2
Haricot vert (gousse) . . . . .	456	31,2	6,85	10,7	0,075	0,164	2,4	22,3
Fraises cultivées . . . . .	378	23,8	6,3	7,4	0,073	0,193	3,06	44
Pollen de lis . . . . .	2	1,8	90	5	0,018	9,0	10,0	200
Germe de fèves . . . . .	0,604	0,506	84	39,3	0,030	49,8	53,6	1 360
<i>Graines :</i>								
Avoine . . . . .	100			2,48	0,035	0,35		16
Betterave à sucre . . . . .	50			6,76	0,028	0,360		8
Plantain <i>psyllium</i> . . . . .	50			3,8	0,029	0,380		45,3
Sainfoin à deux coupes . . . .	50			2,98	0,043	0,860		28,8
Vesce commune . . . . .	30			2,95	0,052	1,05		35,6
Soja oléagineux (grains jaun.)	50			3,72	0,052	1,05		28,4
Pin sylvestre . . . . .	50			7,74	0,053	1,06		13,4
Haricot blanc . . . . .	50	44,9	89,5	3,7	0,070	1,4	1,56	44
Pois chiche . . . . .	50			2,38	0,080	1,6		62
Fève . . . . .	50			2,78	0,083	1,66		59,5
Pois . . . . .	50			2,45	0,132	2,64		108
Trèfle violet . . . . .	50			3,3	0,158	3,16		95,5
Lupin blanc . . . . .	50			2,77	0,210	4,2		302
Méilot de Sibérie . . . . .	50			2,96	0,378	7,36		255

Les résultats de ces opérations sont rassemblés dans le tableau ci-dessus. Dans chaque groupe, les teneurs en molybdène vont en ordre croissant par rapport à la matière sèche. Les résultats analytiques sont parfois donnés pour le molybdène avec trois chiffres significatifs, ces chiffres résultent seulement du calcul, la précision maximum de la méthode étant de 2 à 3 p. 100.

Dans le but de voir si le fait observé jusqu'ici pour certains oligo-éléments, tels que le manganèse [44] et le zinc [45], que les feuilles vertes sont plus riches que les feuilles étiolées, deux essais ont été entrepris, l'un sur un chou, l'autre sur une scarole. Les feuilles vertes du chou ont été reconnues comme ayant une teneur en molybdène nettement plus grande que les feuilles étiolées, mais il n'en a pas été de même pour la scarole. Comme ces deux faits ne suffisent pas pour établir une loi, cette étude sera poursuivie.

Dans la graine, le germe s'est révélé plus riche que les autres parties, tout au moins pour la fève, dans le germe de laquelle j'ai trouvé plus de 53 milligrammes de molybdène au kilogramme sec contre 2 milligrammes pour l'ensemble des téguments et des cotylédons.

**CONCLUSIONS.** — Les résultats relatifs aux plantes entières démontrent la présence de 0 milligr. 54 à 4 milligr. 48 de molybdène par kilogramme de matière sèche, les Crucifères et les Légumineuses étant nettement plus riches.

Les Algues analysées se classent parmi les plantes pauvres.

Les feuilles donnent de 0 milligr. 18 à 3 milligr. 5 au kilogramme sec, sans qu'il se dégage jusqu'ici de règle particulière; tout au plus peut-on dire que les feuilles très aqueuses semblent plus riches.

En ce qui concerne les organes fructifères, la fraise contient relativement beaucoup de molybdène, résultat en accord avec ceux qui ont été obtenus à propos d'autres oligo-éléments.

Dans les graines, le poids de matière sèche n'a été déterminé que dans le cas du haricot, mais comme le taux de matière sèche est en général voisin de 90 p. 100, les chiffres relatifs au kilogramme sec ne diffèrent guère que de 1/10 en plus de ceux donnés pour la matière fraîche. Il y a lieu de remarquer la richesse relativement élevée en molybdène des graines de Légumineuses, richesse qui me paraît ressortir de l'ensemble des chiffres de H. ter Meulen et des miens.

Le pollen de lis, seul pollen analysé, présente une teneur assez forte : 10 milligrammes par kilogramme sec.

Il y a, par contre, lieu de noter que dans un cas, celui de l'écorce d'orange, il n'a pas été trouvé de molybdène dans la prise d'essai de 44 gr. 6, ce qui correspond à moins de 0 milligr. 03 de métal par kilogramme sec.

#### BIBLIOGRAPHIE

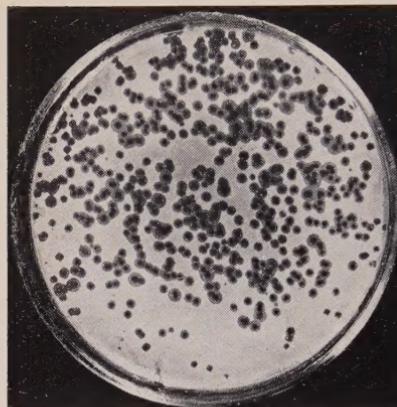
- [1] DEMARÇAY. *C. R. Ac. Sc.*, **130**, 1900, p. 91.
- [2] JORISSEN. *Bull. Soc. chim. belge*, **27**, 1913, p. 21.
- [3] CORNEG. *C. R. Ac. Sc.*, **168**, 1919, p. 513.
- [4] PEREIRA FORJAZ. *C. R. Ac. Sc.*, **189**, 1929, p. 585.
- [5] PEREIRA FORJAZ. *Chim. et Ind.*, n° spécial 829, mars 1931.

- [6] H. TER MEULEN. *Rec. trav. chim. Pays-Bas*, **50**, 1931, p. 491.
- [7] H. TER MEULEN. *Rec. trav. chim. Pays-Bas*, **51**, 1932, p. 549.
- [8] GOLDSCHMIDT (G. M.) et PETERS (Cl.). *Nachr. Ges. Wiss.*, Göttingen, 1933, p. 371.
- [9] DINGWALD (A.), MAC KIBBIN (R. R.) et BEANS (H. T.). *Can. J. Res.*, **11**, 1934, p. 32.
- [10] H. TER MEULEN et RAVENSWAAY (H. J.). *Proc. Koningl. Akad. Wetens.* Amsterdam, **38**, 1935, p. 7.
- [11] STANFIELD (K. E.). *Ind. Eng. Chem. (anal.)*, **7**, 1935, p. 273.
- [12] KAMETARO KONISHI et THOSHIHISA TSUGE. *Mem. Coll. Agr. Kyoto Imp. Univer.*, n° 37 Chem. series 20, 1936, p. 1.
- [13] BERTRAND (Didier). *Bull. Soc. chim. de France*, octobre 1939.
- [14] BERTRAND (Gabriel) et ROSENBLATT (M<sup>me</sup>). *C. R. Ac. Sc.*, **194**, 1932, p. 1405.
- [15] BERTRAND (Gabriel) et ANDREITCHIEVA. *C. R. Ac. Sc.*, **197**, 1932, p. 1374.

---

*Le Gérant : G. MASSON.*

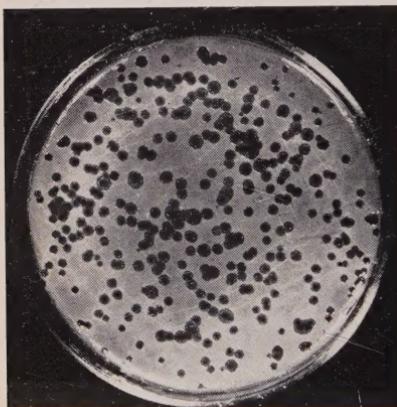




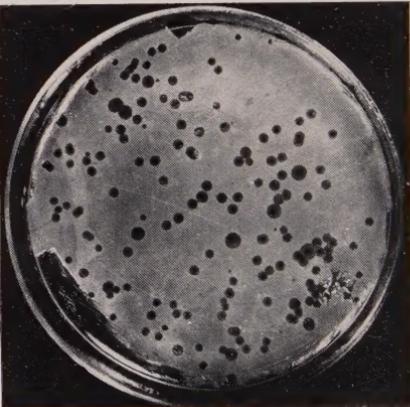
1.



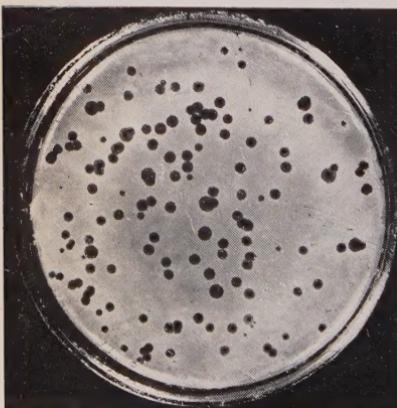
2.



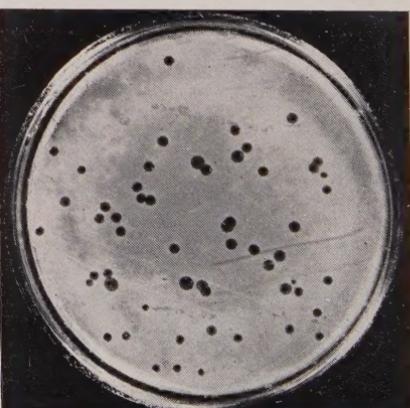
3.



4.

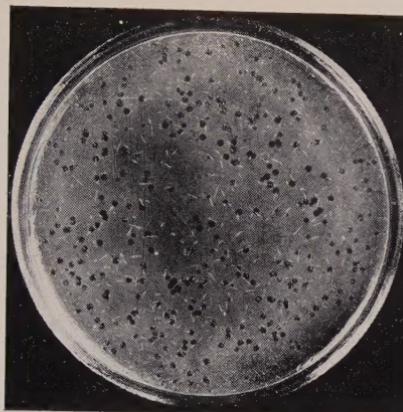


5.

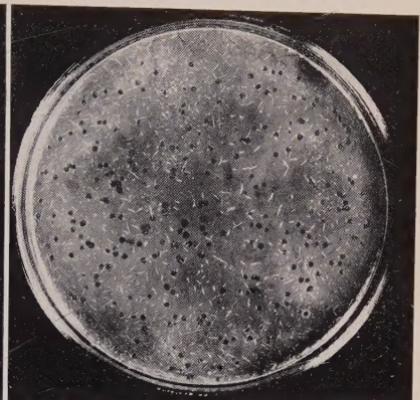


6.

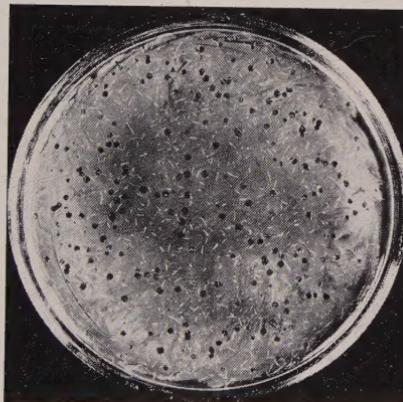
PLANCHE II.



1.



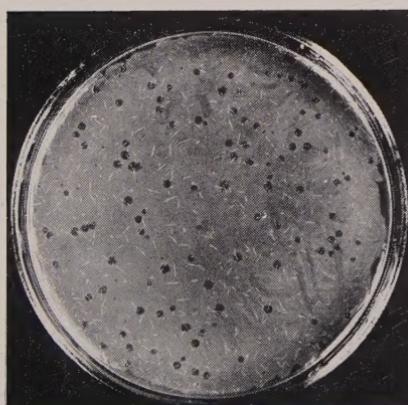
2.



3.



4.



5.



6.

